НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ДУДАРЕНКО
Марина Володимирівна

УДК 612.822:615.853:577.352:661.1:616

ДИСЕРТАЦІЯ

АКТИВНИЙ ТРАНСПОРТ ГАМК У НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПЕРИНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ ТА ЙОГО МОДУЛЮВАННЯ АНТИЕПІЛЕПТИЧНИМИ СПОЛУКАМИ

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____/ Марина ДУДАРЕНКО/

Науковий керівник: **Тетяна БОРИСОВА**, доктор біологічних наук, професор

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Марина ДУДАРЕНКО. Активний транспорт ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів за умов перинатальної гіпоксії та його модулювання антиепілептичними сполуками. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2026.

Дисертація присвячена комплексному вивченню системи активного транспорту ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії та шляхам модулювання транспорту за допомогою антиепілептичних сполук.

Актуальність теми пов'язана з тим, що у світі спостерігається постійне зростання числа пацієнтів з нейрологічними та нейродегенеративними захворюваннями, і це становить глобальну і дотепер невирішену проблему сучасного суспільства. Детальне вивчення складного багатостадійного процесу нейротрансмісії є абсолютно необхідним як для розвитку фундаментальної нейробіології та визначення механізмів розвитку патологічних станів у нервовій системі, так і для терапевтичного модулювання нейрональної активності з метою подолання нейрологічних розладів.

Важливим завданням цієї роботи було дослідити транспортер-залежне накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів та проаналізувати ефективність дії антиепілептичних сполук на

ключові характеристики ГАМКергічної нейротрансмісії за умов норми та моделі перинатальної гіпоксії.

Під час виконання дисертаційної роботи були задіяні як класичні, так і новітні біохімічні та молекулярно-біологічні методи: виділення ізольованих нервових закінчень (синаптосом) різних відділів головного мозку щурів (кори, гіпокампу і таламусу), які проводили згідно методу Котмана, що включає препаративну біохімію та ультрацентрифугування. Варто зазначити, що синаптосоми зберігають усі властивості та характеристики інтактних нервових закінчень. Визначення концентрації протеїну у синаптосомах, мембранного потенціалу синаптосом і стану ацидифікації синаптичних везикул здійснювалось за допомогою підходів спектрофлуориметрії. Початкова швидкість високоафінного накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами була досліджена за допомогою радіоізотопного методу із застосуванням міченої тритієм [^{3}H]ГАМК.

Проведені дослідження вперше показали, що швидкість акумуляції ГАМК синаптосомами кори, гіпокампу і таламусу знижувалась з віком в обох групах тварин – як контрольних, так і щурів, які зазнали впливу перинатальної гіпоксії. Перинатальна гіпоксія суттєво впливає на процес акумуляції позаклітинної ГАМК пресинаптичними терміналями, але вектори і механізми змін виявилися різними в різних структурах головного мозку – якщо у корі не спостерігалось ефекту гіпоксії, а у таламусі вона викликала деяке підвищення акумуляції ГАМК, то у гіпокампі цей процес значно уповільнювався. Це свідчить про порушення балансу гальмівних процесів між гіпокампом і корою внаслідок гіпоксії.

Для з'ясування впливу перинальної гіпоксії на конкретний тип транспортерів ГАМК було застосовано NO-711, високоселективний блокатор ГАМК-транспортерів типу 1 (GAT1), і β-аланін, субстратний інгібітор транспортерів ГАМК типу 3 (GAT3). Отже, вперше було продемонстровано, що здатність β-аланіну інгібувати накопичення ГАМК посилювалась у

нервових закінченнях гіпокампу і таламусу внаслідок перинатальної гіпоксії, в той час як ефективність NO-711 у нервових закінченнях таламусу знижувалась. Цілком вірогідно, що це є результатом зміни співвідношення активних транспортерів – GAT1/GAT3, експресованих на плазматичній мембрані нервових закінчень, внаслідок перинатальної гіпоксії. Цей факт вказує на можливість цілеспрямованої модуляції активності транспортера GAT3 та ГАМК-ергічної нейротрансмісії за умов патологічних станів за допомогою екзогенного та ендогенного β-аланіну.

Застосування антиепілептичного препарату Леветирацетаму показало, що він здійснював свій ефект у пресинаптичній ділянці через збільшення вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу, індукованого калієвою деполяризацією. Але препарат не впливав на позаклітинний рівень ГАМК між епізодами екзоцитозу. Дія Леветирацетаму виявилась різною у гіпокампі, корі і таламусі, і ці ефекти змінювались під час розвитку мозку. Препарат не діяв на вивільнення ГАМК синаптосомами головного мозку щурів у дитячому віці. Леветирацетам мав більш значний вплив на гіпокампальні, кортикальні і таламічні нервові закінчення саме за умов моделі перинатальної гіпоксії, ніж у нормі, тому внаслідок гіпоксії ефективність препарату підвищувалась. Залежність ефектів Леветирацетаму від віку є корисною для нової стратегії застосування цього препарату під час терапії дитячої епілепсії.

Крім того, вперше було виявлено нові ефекти позитивного алостеричного модулятора ГАМК-Б рецепторів, rac-BHFF. Rac-BHFF викликав дозозалежну деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом та зниження ацидифікації синаптичних везикул, що призводило до зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами та, як наслідок, підвищення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК.

Пошук ефективних препаратів на основі молекули ГАМК показав, що аналоги з більшою ліпофільністю легше долають гематоенцефалічний бар’єр.

Введення атомів фтору і невеликих поліфторалкільних груп в молекулу збільшує її ліпофільність, і це широко застосовується для розробки нових біологічно активних сполук та лікарських засобів. Порівняльне дослідження ефективності фторвмісного аналогу ГАМК і вже відомого препарату Прегабаліну вперше показало, що аналог із замісником β-CF_2CF_2H і меншою мірою Прегабалін збільшували початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів. Ефект фторвмісного аналога ГАМК був вищим за ефект Прегабаліну. Також було продемонстровано, що синтезована речовина є структурним, але не функціональним аналогом ГАМК.

Наступним етапом стала оцінка можливостей модулювання накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях нейроактивними сполуками та наночастинками з метою коригування наслідків перинатальної гіпоксії. Отже, вперше було виявлено, що калікс[4]арен С-424, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликав деполяризацію синаптосомальної мембрани та збільшував позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей. Калікс[4]арен С-425 не впливав на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у всіх досліджуваних концентраціях від 10 до 200 мкМ. На відміну від калікс[4]аренів С-424 та С-425, тіакалікс[4]арен С-1193, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликав деполяризацію синаптосомальної мембрани, але збільшував позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей, тільки починаючи з концентрації 100 мкМ.

З метою оцінки нейротоксичного ризику від багатошарового графену, легованого азотом, (N-MLG), вперше було виявлено, що N-MLG не впливав на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах головного мозку щурів у діапазоні концентрацій 0,01–0,5 мг/мл, а збільшення концентрації до 1 мг/мл викликало незначне підвищення (тенденцію до зростання) цього рівня. Отже,

N-MLG немає нейротоксичних ознак та є біосумісним у діапазоні концентрацій 0,01–1 мг/мл.

Дисертаційна робота створює біохімічне підґрунтя та відкриває нові шляхи подолання нейрологічних розладів. Отримані результати розширюють сучасні уявлення про молекулярні механізми регуляції ГАМК-ергічної нейротрансмісії в нормі та за патологічних умов, обґрунтовують перспективність цілеспрямованого впливу на ГАМК-транспортну систему та відповідні пресинаптичні механізми як потенційної терапевтичної стратегії при нейрологічних порушеннях, а також створюють підґрунтя для подальшого пошуку нових нейроактивних сполук із коригувальною та нейропротекторною дією. У всьому світі є значний інтерес до вирішення проблеми контролю нейрональної активності, профілактики та діагностики нейропатологій, ідентифікації тригерних факторів розвитку нейродегенеративних захворювань. Оскільки у світі бракує таких вдосконалених технологій, результати дисертаційної роботи можуть бути використані для розробки нових фармпрепаратів не лише на теренах України, але і за її межами, що також є суттєвим економічним внеском у сталий розвиток нашої Держави.

Ключові слова: ГАМК, синаптосоми, кора головного мозку, гіпокамп, таламус, перинатальна гіпоксія, судоми, епілепсія, високоафінні специфічні транспортери ГАМК, рецептори ГАМК, синаптичні везикули, екзоцитоз, мембранний потенціал нервових закінчень, синапс, пресинаптична мембрана, постсинаптична мембрана, антиепілептичні сполуки, антиконвульсанти, високоселективний блакатор ГАМК-транспортерів NO-711, субстратний інгібітор транспортерів ГАМК β-аланін

ANNOTATION

Maryna DUDARENKO. Active transport of GABA in the rat brain nerve terminals under conditions of perinatal hypoxia and its modulation by antiepileptic compounds. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation for a Philosophy Doctor (Ph.D.) scientific degree in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to a comprehensive study of the system of active transport of GABA in the rat brain nerve terminals under conditions of perinatal hypoxia model and modulation ways of transport processes using antiepileptic compounds.

The relevance of the topic is due to the fact that the world is experiencing a constant increase in the number of patients with neurological and neurodegenerative diseases, and this constitutes a global and still unresolved problem of modern society. A detailed study of the complex multi-stage process of neurotransmission is absolutely necessary both for the development of fundamental neurobiology and the determination of the mechanisms of development of pathological conditions in the nervous system, and for the therapeutic modulation of neuronal activity in order to overcome neurological disorders.

An important task of this work was to investigate the transporter-dependent accumulation and release of GABA in the nerve terminals of the rat brain and to analyze the effectiveness of the action of antiepileptic compounds on the key

characteristics of GABAergic neurotransmission under normal conditions and perinatal hypoxia model.

To perform the dissertation work, both classical and modern biochemical and molecular biological methods were used: the isolation of isolated nerve endings (synaptosomes) from different parts of the rat brain (cortex, hippocampus, and thalamus) was performed according to the Cotman method, which includes preparative biochemistry and ultracentrifugation. It is worth noting that synaptosomes retain all the properties and characteristics of intact nerve terminals. The determination of the protein concentration in synaptosomes, the membrane potential of synaptosomes and the state of acidification of synaptic vesicles was carried out using spectrofluorimetry approaches. The initial rate of high-affinity accumulation of [^{3}H]GABA by synaptosomes was investigated using a radioisotope method using [^{3}H]GABA.

The conducted studies showed for the first time that the rate of GABA accumulation by synaptosomes of the cortex, hippocampus, and thalamus decreases with age in both groups of animals – both control and rats exposed to perinatal hypoxia. Perinatal hypoxia significantly affects the process of accumulation of extracellular GABA by presynaptic terminals, but the vectors and mechanisms of changes turned out to be different in different brain structures – if the effect of hypoxia is not observed in the cortex, and in the thalamus it causes some increase in GABA accumulation, then in the hippocampus this process is significantly slowed down. This indicates a violation of the balance of inhibitory processes between the hippocampus and the cortex due to hypoxia.

To investigate the effects of perinatal hypoxia on a specific type of GABA transporter, NO-711, a highly selective blocker of GABA transporter type 1 (GAT1), and β-alanine, a substrate inhibitor of GABA transporter type 3 (GAT3), were used. Thus, it was demonstrated for the first time that the ability of β-alanine to inhibit GABA accumulation is enhanced in hippocampal and thalamus nerve terminals due to perinatal hypoxia, while the efficacy of NO-711 in thalamic nerve

terminals is reduced. It is quite likely that this is the result of a change in the ratio of active transporters – GAT1/GAT3, expressed on the plasma membrane of nerve endings, due to perinatal hypoxia. This fact indicates the possibility of targeted modulation of GAT3 transporter activity and GABA-ergic neurotransmission under pathological conditions using exogenous and endogenous β-alanine.

The antiepileptic drug Levetiracetam has been shown to exert its effects in the presynaptic region by increasing the release of [^{3}H]GABA by exocytosis induced by potassium depolarization. However, the drug does not affect the extracellular level of GABA between episodes of exocytosis. The effects of Levetiracetam were found to be different in the hippocampus, cortex, and thalamus, and these effects change during brain development. The drug does not affect the release of GABA by synaptosomes in the rat brain during childhood. Levetiracetam has a more significant effect on hippocampal, cortical, and thalamic nerve terminals precisely under conditions of perinatal hypoxia than in normal conditions, so hypoxia increases the effectiveness of the drug. The dependence of the effects of Levetiracetam on age is useful for a new strategy for using this drug in the treatment of childhood epilepsy.

In addition, novel effects of a positive allosteric modulator of $GABA_B$ receptors, rac-BHFF, were discovered for the first time. Rac-BHFF causes dose-dependent depolarization of the plasma membrane of synaptosomes and a decrease in acidification of synaptic vesicles, which leads to a decrease in the initial rate of [^{3}H]GABA accumulation by synaptosomes and, consequently, an increase in extracellular levels of [^{3}H]GABA.

The search for effective drugs based on the GABA molecule has shown that analogues with greater lipophilicity more easily cross the blood-brain barrier. The introduction of fluorine atoms and small polyfluoroalkyl groups into the molecule increases its lipophilicity, and this is widely used for the development of new biologically active compounds and drugs. A comparative study of the effectiveness of a fluorine-containing GABA analog and the already known drug Pregabalin

showed for the first time that the analog with the β-CF_2CF_2H substituent and, to a lesser extent, Pregabalin increase the initial rate of [^{3}H]GABA accumulation. The effect of the fluorine-containing analogue of GABA was higher than that of Pregabalin. It was also demonstrated that the synthesized substance is a structural, but not a functional analogue of GABA.

The next stage was to assess the possibilities of modulating the accumulation and release of GABA in nerve terminals with neuroactive compounds and nanoparticles in order to correct the consequences of perinatal hypoxia. Thus, it was first discovered that calix[4]arene C-424, starting at a concentration of 50 μM, causes depolarization of the synaptosomal membrane and increases the extracellular level of [^{3}H]GABA in nerve terminal preparations. Calix[4]arene C-425 does not affect the extracellular level of [^{3}H]GABA at all concentrations tested from 10 to 200 μM. In contrast to calix[4]arenes C-424 and C-425, thiacalix[4]arene C-1193, starting at a concentration of 50 μM, causes depolarization of the synaptosomal membrane and increases the extracellular level of [^{3}H]GABA in nerve terminal preparations, starting at a concentration of 100 μM.

In order to assess the neurotoxic risk of nitrogen-doped multilayer graphene (N-MLG), it was first found that N-MLG did not affect the extracellular level of [^{3}H]GABA in rat brain synaptosomes in the concentration range of 0.01–0.5 mg/ml, and increasing the concentration to 1 mg/ml caused a slight increase (increasing trend) of this level. Therefore, N-MLG has no neurotoxic features and is biocompatible in the concentration range of 0.01–1 mg/ml.

The dissertation work creates a biochemical basis and opens up new ways to overcome neurological disorders. The results obtained expand modern ideas about the molecular mechanisms of regulation of GABAergic neurotransmission in normal and pathological conditions, substantiate the prospects of targeted influence on the GABA transport system and the corresponding presynaptic mechanisms as a potential therapeutic strategy for neurological disorders, and also create a basis for

further search for new neuroactive compounds with corrective and neuroprotective effects. There is significant interest worldwide in solving the problem of controlling neuronal activity, preventing and diagnosing neuropathologies, and identifying trigger factors for the development of neurodegenerative diseases. Since the world lacks such advanced technologies, the results of the dissertation work can be used to develop new pharmaceuticals not only in Ukraine, but also abroad, which is also a significant economic contribution to the sustainable development of our State.

Keywords: GABA, synaptosomes, cerebral cortex, hippocampus, thalamus, perinatal hypoxia, seizures, epilepsy, high-affinity specific GABA transporters, GABA receptors, synaptic vesicles, exocytosis, membrane potential of nerve terminals, synapse, presynaptic membrane, postsynaptic membrane, antiepileptic compounds, anticonvulsants, NO-711 highly selective GABA transporter blocker, β-alanine substrate inhibitor of GABA transporters

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Yatsenko L., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Himmelreich N. The dynamics of changes in hippocampal GABAergic system in rats exposed to early-life hypoxia-induced seizures. **Neurosci Lett. 2012,** Aug 30;524(2):69-73. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.015. **(Q2)**

   Яценко Л. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Гіммельрейх Н. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

2. 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,** Jun 1;55(3):250-8. doi: 10.3325/cmj.2014.55.250. (**Q2)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Яценко Л. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Гіммельрейх Н. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

   Крупко О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

3. **Дударенко М.В.**, Яценко Л.М., Піскова М.В. Вплив NO-711 і бета-аланіну на накопичення глутамату та γ-аміномасляної кислоти нервовими терміналями головного мозку щурів після перинатальної гіпоксії. **Biotechnologia Acta. 2015,** Vol.8, N3., С.67-77.

   Дударенко М.В. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Яценко Л.М. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

   Піскова М.В. – супровід експериментальної роботи.

4. Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Borisova T. New effects of GABAB receptor allosteric modulator rac-BHFF on ambient GABA, uptake/release, Em and synaptic vesicle acidification in nerve terminals. **Neuroscience. 2015**, Vol.304., P.60-70. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.037. (**Q4)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування,;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

5. Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Borisova T. Age-dependency of Levetiracetam effects on exocytotic GABA release from nerve terminals in the hippocampus and cortex in norm and after perinatal hypoxia. **Cell Mol Neurobiol. 2019,** Jul;39(5):701-714. doi: 10.1007/s10571-019-00676-6. (**Q2)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування,;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

6. **Dudarenko M.V.**, Pozdnyakova N.G. Perinatal hypoxia and thalamus brain region: Increased efficiency of antiepileptic drug levetiracetam to inhibit GABA release from nerve terminals. **Ukr.Biochem.J. 2022**; Vol.94, Iss.5, Sep-Oct, P.28-39.

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

7. **Dudarenko, M.**, Krisanova, N., Pozdnyakova , N., Pastukhov, A., Pariiska, O., Kurys, Y., Sotnik S., Kolotilov S. V., Koshechko V., Borisova T. Assessment of acute neurotoxicity of nitrogen-doped multilayer graphene nanoparticles and their capability to change Cd^{2+}/Pb^{2+}/Hg^{2+}-induced injury in brain cortex nerve terminals. **Biotechnologia Acta. 2023,** 16(5), 45-54.

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Крисанова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Пастухов А. – супровід експериментальної роботи;

   Парійська О. – синтез і характеризація графенових наночастинок;

   Курис Є. – синтез і характеризація графенових наночастинок;

   Сотнік С. – аналіз та візуалізація даних;

   Колотілов С. – аналіз та візуалізація даних;

   Кошечко В. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

8. Shatursky O.Y., Krisanova N.V., Pozdnyakova N., Pastukhov A.O., **Dudarenko M.**, Kalynovska L., Shkrabak A.A., Veklich T.O., Selikhova A.I., Cherenok S.O., Borisova T.A., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Substitution of bridge carbons for sulphur in calix[4]arene-bis-α-hydroxymethylphosphonic acid transformed mobile carrier into ionic channel accompanied with evoked muscle contraction and impaired neurotransmission powered by membrane action of resulting thiocalix[4]arene-bis-α-hydroxymethylphosphonic acid. **Toxicol In Vitro**. **2024,** Jun;98:105815. doi: 10.1016/j.tiv.2024.105815. (**Q2)**

Шатурський О.Я. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Крисанова Н.В. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Позднякова Н.Г. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Пастухов А.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Дударенко М.В. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Калиновська Л.М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Шкрабак О.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування;

Векліч Т.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування;

Селіхова А.І. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Черенок С. О. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Борисова Т.О. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Кальченко В.І. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Костерін С.О.– ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

9. Yatsenko L.N., Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Parkhomenko N.T., Himmelreich N.H. Activity of GABA transporters in the cortex, hippocampus and thalamus of the developing rat brain. Effect of perinatal hypoxia. Abstracts of Eighth International Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology", Sudak, Crimea, Ukraine, 2-12 june, **2012**, P.466.
10. Yatsenko L.N., Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Himmelreich N.H. Levetiracetam increases GABA release from cortical, hippocampal and thalamic synaptosomes of rats exposed to perinatal hypoxia. Abstracts of Ninth International Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology", Sudak, Crimea, Ukraine, 3-13 june **2013**, P.385.
11. Krupko O., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Krisanova N., Borisova T. High-affinity sodium-dependent uptake and exocytotic release of [^{3}H]GABA from nerve terminals under centrifuge-induced hypergravity. 15-а Українська конференція з космічних досліджень. 24-28 серпня 2015 р., Одеса, Україна : Тези доповідей конференції. **2015**, С.45.
12. Borisova T.A., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N. $GABA_B$ receptor positive allosteric modulator rac-BHFF: Influence of onthe extracellular level, uptake/release of [^{3}H]GABA, Em and synapticvesicle acidification in cortical and hyppocampal presynaptic nerveterminals. RECOOP HST

"Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference", April 16-19, 2015, Wrosclaw, Poland. **2015**, P.48.

13. Borisova T., Dekaliuk M., Pozdnyakova N., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Nazarova A., Borysov A., Demchenko A.P. Fluorescent and neuroactive properties of carbon dots synthesized from sulphur-containing carbohydrate precursor. Abstracts of RECOOP HST association 6th TriNet Meeting Prague, October, 15-18, **2015**, P.34.
14. Borysov A., Pozdnyakova N., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Nazarova A., Borisova T. Neurotoxic properties of carbon dots synthesized from sulphur-containing carbohydrate precursor. Abstracts of RECOOP HST association, Bridges in life sciences 11th annual scientific conference, April, 7-10, **2016**, Prague, Czech Republic, Abstract Book, P.39.
15. **Дударенко М.В.**, Позднякова Н.Г. Вплив нових фторвмісних аналогів ГАМК на накопичення [^{3}H]ГАМК нервовивими терміналями головного мозку щурів. Тези Наукової Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 26-27 травня **2016** р., С.18.
16. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Pastukhov A., Borisova T. The effects of an allosteric modulator of the $GABA_B$ receptor, rac-BHFF, on Em, synaptic vesicle acidification, and transport of GABA and glutamate in nerve terminals. Acta Biochimica Polonica (Supplement 1, 2016) Abstracts of X PARNAS CONFERENCE YOUNG SCIENTIST FORUM "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine", July, 10-12, **2016**, Wrocław, Poland, P.22.
17. **Dudarenko M.**, Galkin M.O., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Krupko O., Nazarova A., Borysov A., Krisanova N., Borisova T. Combined effects of nanodiamonds and inorganic Martian dust simulant on glutamaergic neurotransmission. 16-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень **2016**, Збірник тез, С.48.

18. Krupko O., Krisanova N., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Borisova T. The influence of altered gravity conditions on the protonophore-evoked glutamate release. 16-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень **2016**, Збірник тез, С.50.
19. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Kaminskyy D., Kryshchyshyn A., Lesyk R., Borysova T. 4-Thiazolidinone derivatives change the membrane potential of rat brain nerve terminals. RECOOP HST Association, Bridges in life sciences 13th Annual Scientific Conference, April 11-15, **2018**, Zagreb, Croatia, P.38.
20. Borysov A., Galkin M., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Krisanova N., Borisova T. Neurotoxic level of synthesized, native and physiological nanoparticles: a comparative analysis. RECOOP HST Association, Bridges in life sciences 13th Annual Scientific Conference, April 11-15, **2018**, Zagreb, Croatia, P.43.
21. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Kaminskyy D., Kryshchyshyn A., Lesyk R., Borysova T. Novel 4-Thiazolidinone derivatives change the acidification ofsynaptic vesicles in rat brain nerve terminals. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine: Ukr. Biochem. J., **2018**, V.90, Special Issue, P.40.
22. **Dudarenko M.V.**, Krisanova N.V., Pastukhov A.O., Pozdnyakova N.G., Borisova T.O. Inorganic analogue of martian dust enriched with novel carbon nanoparticles: neurotoxicity assessment in vitro using brain nerve terminals. 18th Ukrainian Conference on Space Research, September 17-20, **2018**, Kyiv, Ukraine, P.61.
23. Pastukhov A., Borysov A., Galkin M., Paliienko K., Pozdnyakova N., KrisanovaN., **Dudarenko M.**, Babic M., Horak D., Lesiak A., Podhorodecki A., Borisova T. Modulation of neuroactive properties of nanoparticles by protein biocorona. RECOOP HST Association, RECOOP 9th Annual

Project Review Meeting, October 11-14, **2018**, Bratislava, Slovak Republic, P.29.

24. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N. Levetiracetam effects on exocytotic GABA release from thalamic nerve terminals in norm and after perinatal hypoxia. RECOOP HST Association, RECOOP 10th Annual Project Review Meeting, October 11-12, 2019, Wroclaw, Poland. – **2019**, P. 75.
25. Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Grytsaenko V.V., Pastukhov A.O., Krisanova N.V., Kaminskyy D.V., Kryshchyshyn A.P., Lesyk R.B., Borysova T.A. Novel neuroactive 4-thiazolidinone derivative, Les-2769: Effects on the ambient level and uptake of GABA and glutamate in presynaptic nerve terminals. RECOOP 15th Bridges in Life Sciences and 3rd International Student Video Conferences online on October 1-2, **2020**, Abstract book, P .56.
26. Kalynovska L., Paliienko K., Korbush M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Borysov A., Tarasenko A., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Garmanchuk L., Dovbynchuk T., Tolstanova G., Borisova T. Effect of smoke aerosol particulate matter from peat on gut and brain cell functioning. 4 th International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences. April 7 - 8, **2022,** Prague, Czech Republic, Abstract book, P.134.
27. Pastukhov A., Pozdnyakova N., Krisanova N., **Dudarenko, M.**, Paliienko K., Tarasenko A., Kalynovska L., Borisova T. A comparative study of neuroactive properties of particulate matter from plastic/wood smoke aerosols and gasoline engine exhaust. FEBS congress, FEBS Open Bio. **2023,** - 13 (Suppl. S2), P.61–258. doi: 10.1002/2211-5463.13646.
28. **Dudarenko M.V.**, Paliienko K.O., Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Borysov A.A., Pastukhov A.O., Kalynovska L.M., Borisova T.O. Different neuroactive properties of smoke particulate matter from plastic and wood combustion and gasoline engine exhaust. 5th

RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences. April 20-21, **2023,** Budapest, Hungary, Abstract book, P.129.

29. **Dudarenko M.**, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Panas I., Borisova T. Modulatory effect of carbon dots on mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals. 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11-12, **2024**, Bratislava, Slovakia, Abstract book, P.78.
30. Krisanova N., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Pastukhov A., Sivko R., Driuk M., Kalynovska L., Dovbeshko G., Borisova T. Neuroactive properties of war-derived air pollution nanohybrids. 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11-12, **2024**, Bratislava, Slovakia, Abstract book, P.63.
31. **Dudarenko M.V.**, Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Pastukhov A.O., Driuk M.M., Panas I.D., Borisova T.O. Spontaneous ROS generation in the presynaptic brain nerve terminals during combined application of cadmium and smoke PM preparations. 20th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 2-3, **2025**, Prague, Czech Republic, Abstract book, P.13.

Патенти України

1. Патент України №114258. Заявка на корисну модель № u 2016 06906, МПК (2016.01) A61K 31/02, A61K 31/325, A61K 49/00, G01N 33/483. Фторовмісний аналог γ-аміномасляної кислоти із замісником β-CF_2CF_2H, що викликає збільшення початкової швидкості накопичення та зниження стимульованого деполяризацією плазматичної мембрани вивільнення γ-аміномасляної кислоти нервовими терміналями головного мозку щурів / Борисова Т.О., Позднякова Н.Г., Дударенко М.В., Кухар В.П., Герус І.І., Шайтанова О.М., Заявники та патентовласники Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України – заявл. 24.06.2016.

ЗМІСТ

ЗМІСТ *22*

ВСТУП *26*

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ *35*

1.1 ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ ТА ЇЇ УЧАСТЬ У РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ МОЗКУ **35**

1.1.1. Характеристика ГАМК-ергічної системи 35

1.1.2. Роль ГАМК-ергічної системи у розвитку патологій, викликаних перинатальною гіпоксією 38

1.2. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВИНИКНЕННЯ ЕПІЛЕПТИЧНОЇ ХВОРОБИ **40**

1.2.1. Причини епілепсії 41

1.2.2. Метаболічні порушення при перинатальних ускладненнях 45

1.2.3. Біохімічні аспекти гіпоксичного ураження головного мозку 46

1.3. ТРАНСПОТЕРИ ГАМК: ЛОКАЛІЗАЦІЯ, ТИПИ, ВЛАСТИВОСТІ ТА РОЛЬ У РОЗВИТКУ НЕЙРОПАТОЛОГІЙ **53**

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМНТАЛЬНА ЧАСТИНА **58**

2.1. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ **58**

2.1.1. Матеріали, реактиви та обладнання 58

2.1.2. Умови створення експериментальної моделі перинатальної гіпоксії 58

2.1.3. Етичні норми 59

2.1.4. Отримання синаптосом з головного мозку щурів 59

2.1.5. Визначення концентрації протеїну 60

2.1.6. Визначення акумуляції [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів 61

2.1.7. Визначення вивільнення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів 62
2.1.8. Оцінка мембранного потенціалу синаптосом 63
2.1.9. Оцінка стану ацидифікації синаптичних везикул 64
2.1.10. Статистична обробка отриманих результатів 64

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 65

3.1. Особливості роботи транспортерів ГАМК у корі, таламусі та гіпокампі головного мозку щурів за умов моделі перинальної гіпоксії 65

3.2. Вплив NO-711 та β-аланіну на високоафінне транспортер-опосередковане накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів 76

3.2.1. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями кори головного мозку щурів 76
3.2.2. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями гіпокампу щурів 79
3.2.3. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями таламусу щурів 81

3.3. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на ключові характеристики ГАМКергічної нейропередачі у різних відділах головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії 86

3.3.1. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у корі головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії 86
3.3.2. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у гіпокампі щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії 88

3.3.3. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у таламусі щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії 90

3.3.4. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на екзоцитоз [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу, таламусу і кори головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії 93

3.4. Оцінка можливості модулювання накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях нейроактивними сполуками та наночастинками з метою корегування наслідків перинатальної гіпоксії 98

3.4.1. Вплив rac-BHFF, нового алостеричного модулятора $GABA_B$ рецепторів, на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів, мембранний потенціал та протонний градієнт синаптичних везикул синаптосом 98

3.4.2. Вплив фторовмісного аналогу γ-аміномасляної кислоти із замісником β-CF_2CF_2H на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів 103

3.4.3. Вплив каліксаренів на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів 110

3.4.4. Вплив багатошарових наночастинок графену, легованих азотом, на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах кори головного мозку щурів 114

ВИСНОВКИ ***117***

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ ***120***

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ГАД – глутаматдекарбоксилаза

ГАМК – гама-аміномасляна кислота

ГАМК-Т – ГАМК-трансаміназа

ГМ – головний мозок

ДТТ – дитіотреїтол

ЕДТА – (EDTA) етилендиамінтетраоцтова кислота

ЕГТА – (EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid), етиленгліколь-біс-(2-аміноетил)-тетраоцтова кислота

ФФК – фосфофруктокіназа

ЦНС – центральна нервова система

ACS – (aqueous counting scintillate) сцинтиляційна рідина для водних зразків

GATs – високоафінні специфічні транспортери ГАМК

GAT1 – ГАМК-транспортер типу 1

GAT2 – ГАМК-транспортер типу 2

GAT3 – ГАМК-транспортер типу 3

OCS – (organic counting scintillate) сцинтиляційна рідина для нерозчинних зразків

Rh 6G – флуоресцентний потенціал-чутливий зонд родамін 6G

str. radiatum – шар гіпокампу, розташований над шаром пірамідних клітин, складається з інтернейронів та їх аксонів, а також дендритів пірамідних клітин

ВСТУП

Актуальність теми. У центральній нервовій системі (ЦНС) ссавців глутамат та γ-аміномасляна кислота (ГАМК) є основними збуджуючим та гальмівним медіаторами, які беруть участь у здійсненні більшості функцій головного мозку, зокрема розпізнаванні, пам'яті, навчанні.

Комунікація нейронів забезпечується процесом вивільнення низькомолекулярних хімічних сполук, нейромедіаторів, з пресинаптичних нервових терміналей та їх взаємодією зі специфічними структурами – рецепторами постсинаптичних нейронів. Основною мікроструктурою, що забезпечує передачу інформації від одного нейрону до іншого є синапс.

Баланс між процесами збудження і гальмування є ключовим фактором нормального функціонування ЦНС. Передача нервового сигналу ініціюється деполяризацією плазматичної мембрани пресинаптичного нервового закінчення і призводить до вивільнення нейромедіаторів шляхом екзоцитозу в синаптичну щілину, їх взаємодії з рецепторами постсинаптичної мембрани та активації сигнальних шляхів. Тому концентрація нейромедіаторів у позаклітинному середовищі визначає ступінь стимуляції рецепторів. Вкрай важливо, щоб позаклітинні концентрації нейромедіаторів підтримувалися на низькому рівні.

Низький позаклітинний рівень нейромедіаторів підтримується лише за допомогою транспортування їх до пресинаптичної нервової терміналі, тому що метаболізм цих сполук не відбувається у позаклітинному середовищі. Отже, певна концентрація позаклітинних глутамату та ГАМК врівноважує процеси збудження та гальмування в процесі нейропередачі.

Порушення транспорту глутамату та ГАМК, зростання позаклітинного рівня обох нейромедіаторів викликає дисбаланс збуджуючих/гальмівних сигналів, що є характерною рисою патогенезу майже всіх нейрологічних захворювань [1-4].

Гальмівна ГАМКергічна система відіграє ключову роль у контролі нейрональної збудливості і підтримці балансу між процесами гальмування і збудження. Основним механізмом вивільнення ГАМК з пресинаптичних нервових терміналей є стимульований деполяризацією плазматичної мембрани Ca^{2+}-залежний екзоцитоз − злиття синаптичних везикул з плазматичною мембраною. ГАМК реалізує свою сигнальну функцію, діючи на іонотропні (ГАМК-А та ГАМК-С) та метаботропні (ГАМК-Б) рецептори, розташовані на поверхні клітин, що їх експресують [5-7].

Сполуки, які впливають на процес гальмування, найчастіше входять до арсеналу протисудомних медичних препаратів, а дія ефективних антиконвульсантів найчастіше обумовлена їх впливом на функціонування транспортерів ГАМК, врезультаті чого підвищується позаклітинний рівень ГАМК. Серед інгібіторів ГАМК транспортерів тільки тіагабін – селективний інгібітор транспортера GAT1, використовується в клінічній практиці під час лікування судом. Таким чином, інгібітори накопичення ГАМК є дуже перспективними агентами з їх потенційним застосуванням в лікуванні епілепсії, болю, наркоманії, порушення сну та ін. [7-13].

Одним з найбільш ефективних методичних підходів до розробки нових регуляторів внутрішньоклітинної/позаклітинної концентрації та гомеостазу ГАМК в центральній нервовій системі є структурна модифікація ГАМК. Різні похідні ГАМК та її аналоги широко відомі в якості лікарських засобів, наприклад, вігабатрин [14], баклофен (Lioresal® and Baclon®) [15], габапентин (GBP, Neurontin®) [16], прегабалін (Lyrica®, β-i-Bu-GABA) [17, 18].

Незважаючи на інтенсивні дослідження процесу нейротрансмісії, розуміння всієї сукупності подій в пре- і постсинаптичних частинах синапса у вигляді ланцюгових і розгалужених процесів недостатнє. У світі спостерігається постійне зростання числа пацієнтів з нейрологічними та нейродегенеративними захворюваннями, що становить глобальну і дотепер

невирішену проблему сучасного суспільства. Детальне вивчення складного багатостадійного процесу нейротрансмісії є абсолютно необхідним як для розвитку фундаментальної нейробіології, так і для визначення механізмів розвитку патологічних станів у нервовій системі.

Мета і завдання дисертаційної роботи. Дослідження транспортер-залежного накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів та аналіз ефективності дії антиепілептичних сполук на ключові характеристики ГАМКергічної нейротрансмісії у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1) Дослідити інтенсивність накопичення [^{3}H]ГАМК нервовими терміналями кори, гіпокампу і таламусу головного мозку щурів у нормі та моделі перинатальної гіпоксії;

2) Проаналізувати ефективність дії інгібіторів транспортерів ГАМК, NO-711 та β-аланіну, на процеси транспортер-залежного накопичення та вивільнення [^{3}H]ГАМК з нервових терміналей кори, гіпокампу і таламусу головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії;

3) Оцінити вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на ключові характеристики ГАМКергічної нейропередачі у різних відділах головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії;

4) Запропонувати нові шляхи корекції порушень транспорту ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів внаслідок перинатальної гіпоксії за допомогою модуляторів ГАМК-рецепторів, новосинтезованих аналогів ГАМК та сполук, які є потенційними антиконвульсантами, а також за допомогою наночастинок різної хімічної природи.

Об’єкт дослідження: активний транспорт ГАМК в ізольованих нервових закінченнях (синаптосомах) головного мозку щурів.

Предмет дослідження: функціонування ГАМК-транспортерів за умов моделі перинатальної гіпоксії; модуляція активного транспорту ГАМК відомими антиепілептичними препаратами та новосинтезованими сполуками, що володіють потенційною антиепілептичною активністю.

Методи, використані в роботі. Створення експериментальної моделі перинатальної гіпоксії у щурів, препаративна біохімія, виділення синаптосом головного мозку за методом Котмана, ультрацентрифугування, спектрофлуориметрія, радіоізотопний метод із застосуванням міченої [^{3}H]ГАМК.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що швидкість акумуляції ГАМК синаптосомами кори, гіпокампу і таламусу знижується відносно 1-го тижня на 2-й, 4-й та 8-й тижні експерименту як контрольних, так і щурів, які зазнали впливу перинатальної гіпоксії. Перинатальна гіпоксія суттєво впливає на процес акумуляції позаклітинної ГАМК пресинаптичними терміналями, але вектори і механізми змін виявилися різними в різних структурах головного мозку – якщо у корі не спостерігалося ефекту гіпоксії, а у таламусі вона викликала деяке підвищення акумуляції ГАМК, то у гіпокампі цей процес значно уповільнювався. Це свідчить про порушення балансу гальмівних процесів між гіпокампом і корою внаслідок гіпоксії. Також продемонстровано, що здатність субстратного інгібітора транспортерів ГАМК, β-аланіну, інгібувати накопичення ГАМК посилюється у нервових закінченнях гіпокампу і таламусу внаслідок перинатальної гіпоксії, в той час як ефективність високоселективного блакатора ГАМК-транспортерів, NO-711, у нервових закінченнях таламусу знижується. Це може бути наслідком зміни співвідношення активних транспортерів – GAT1/GAT3, експресованих на плазматичній мембрані нервових закінчень, після перинатальної гіпоксії. Цей факт вказує на можливість цілеспрямованої модуляції активності транспортера GAT3 та ГАМК-ергічної нейротрансмісії за умов патологічних

станів за допомогою екзогенного та ендогенного природного β-аланіну. Застосування антиепілептичного препарату Леветирацетаму показало, що він здійснював свій ефект у пресинаптичній ділянці через збільшення вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу, індукованого калієвою деполяризацією. Але препарат не впливав на позаклітинний рівень ГАМК між епізодами екзоцитозу. Дія Леветирацетаму виявилась різною у гіпокампі, корі і таламусі, і ці ефекти змінюються під час розвитку мозку. Препарат не діяв на вивільнення ГАМК синаптосомами головного мозку щурів у дитячому віці. Вперше продемонстровано, що Леветирацетам мав більш значний вплив на гіпокампальні, кортикальні і таламічні нервові закінчення саме за умов моделі перинатальної гіпоксії, ніж у нормі, тому внаслідок гіпоксії ефективність препарату підвищується. Залежність ефектів Леветирацетаму від віку є корисною для нової стратегії застосування цього препарату під час терапії дитячої епілепсії. Крім того, вперше було виявлено нові ефекти позитивного алостеричного модулятора ГАМК-Б рецепторів, rac-BHFF. Rac-BHFF викликає дозозалежну деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом та зниження ацидифікації синаптичних везикул, що призводить до зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами та, як наслідок, підвищення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК. Пошук ефективних препаратів на основі молекули ГАМК вперше показав, що аналоги з більшою ліпофільністю легше долають гематоенцефалічний бар'єр. Введення атомів фтору і невеликих поліфторалкільних груп в молекулу збільшує її ліпофільність, і це широко застосовується для розробки нових біологічно активних сполук та лікарських засобів. Порівняльне дослідження ефективності фторвмісного аналогу ГАМК і вже відомого препарату Прегабаліну показало, що аналог із замісником β-CF_2CF_2H і меншою мірою Прегабалін збільшують початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК. Ефект фторвмісного аналога ГАМК був вищим за ефект Прегабаліну. Продемонстровано, що синтезована речовина є структурним,

але не функціональним аналогом ГАМК. Також було виявлено, що калікс[4]арен С-424, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликає деполяризацію синаптосомальної мембрани та збільшує позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей. Калікс[4]арен С-425 не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у всіх досліджуваних концентраціях від 10 до 200 мкМ. На відміну від калікс[4]аренів С-424 та С-425, тіакалікс[4]арен С-1193, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликає деполяризацію синаптосомальної мембрани та збільшує позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей, починаючи з концентрації 100 мкМ. З метою оцінки нейротоксичного ризику багатошарового графену, легованого азотом, (N-MLG), було виявлено, що N-MLG не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах головного мозку щурів у діапазоні концентрацій 0,01–0,5 мг/мл, а збільшення концентрації до 1 мг/мл викликало незначне підвищення (тенденцію до зростання) цього рівня. Отже, N-MLG немає нейротоксичних ознак та є біосумісним у діапазоні концентрацій 0,01–1 мг/мл.

Практичне значення одержаних результатів. Успішне виконання завдань дисертаційної роботи створює біохімічне підґрунтя та відкриває нові шляхи подолання нейрологічних розладів, діагностики нейропатологій, ідентифікації тригерних факторів розвитку нейродегенеративних захворювань. Враховуючи зростання частоти посттравматичних стресових розладів та нейропатологій на фоні війни в Україні, результати дисертаційної роботи можуть бути використані для розробки нових фармацевтичних препаратів, що також є суттєвим економічним внеском у сталий розвиток нашої держави.

Особистий внесок здобувача. Тему, мету та завдання роботи було сформульовано дисертанткою спільно з науковим керівником зав. відділу, проф., д.б.н. Т.О. Борисовою. Виділення синаптосом з різних відділів (кора, гіпокамп, таламус) головного мозку щурів проведено спільно зі с.н.с. Н.Г.

Поздняковою, н.с. А.О. Пастуховим та н.с. Сівком Р.В. Приготування стокових і буферних розчинів та інших реактивів здійснено спільно зі с.н.с. Н.Г. Поздняковою та н.с А.О. Пастуховим. Радіоізотопні дослідження із застосуванням міченої [^{3}H]ГАМК та ультрацентрифугування, виконані дисертанткою особисто. Спектрофлуориметричні дослідження здійснено спільно зі с.н.с. Н.В. Крисановою. Аналіз результатів досліджень та їх узагальнення здійснено спільно з науковим керівником зав. відділу, проф. Т.О. Борисовою та с.н.с. Н.Г. Поздняковою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема № 3, Державний реєстраційний номер: 0124U000232, «Молекулярні механізми порушення транспортування збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів у пресинапсі за умов нейропатологій та шляхи його корегування», (з 2024); тема № 3, Державний реєстраційний номер: 0119U002509, «Вивчення механізмів регуляції та рецептор-опосередкованої модуляції екзоцитозу та активного транспорту нейромедіаторів у пресинапсі в нормі та за умов, що призводять до розвитку нейропатологій», (2019-2023); тема № 3, Державний реєстраційний номер: 0114U003214, «Екзоцитоз та активний транспорт нейромедіаторів у пресинапсі в нормі та за умов розвитку нейропатологій: регуляція, рецептор-опосередкована модуляція та пошук шляхів нейропротекції», (2014-2018); проєкт № 35, Державний реєстраційний номер: 0115U003641, у рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» «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», (2015–2019); проект № 2021.01/0061 Національного фонду досліджень України «Кумулятивний нейротоксичний ефект від мультикомпонентного забруднення твердими

частинками повітря та нейроактивними фармацевтичними препаратами, біоматеріалами (зокрема SARS-COV-2), токсичними металами та його подолання», (з 2023); № 21 «Мультикомпонентне забруднення твердими частинками аерозолю, стійкими токсичними забруднювачами, важкими металами: розроблення методології оцінки ризиків, сенсингу, нейропротекції для визначення істотних змінних в сервісах оцінювання відповідних індикаторів SDG» у рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Аерокосмічні спостереження довкілля в інтересах сталого розвитку та безпеки» (ERAPLANET/UA), (2021-2023); проект №12 “Фторовмісні аналоги глутамату та γ-аміномасляної кислоти: синтез та аналіз модуляторного впливу на транспорт нейромедіаторів в нервових терміналях головного мозку” у рамках цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва» у співпраці з Інститутом біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, (2014-2016).

Апробація результатів дисертації. Дисертантка представила результати виконання дисертаційної роботи на міжнародних та вітчизняних конференціях. Зокрема, на 20th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (1-4 квітня 2025 р., Прага, Чехія); 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (11-12 квітня 2024 р., Братислава, Словаччина); 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences (20-21 квітня 2023 р., Будапешт, Угорщина); RECOOP 10th Annual Project Review Meeting, (11-12 жовтня 2019 р., Вроцлав, Польща); XII Українському біохімічному конгресі (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль, Україна); 18th Ukrainian Conference on Space Research (17-20 вересня 2018 р., Київ, Україна); XIth Parnas Conference (3-5 вересня 2018 р., Київ, Україна); RECOOP HST Association, Bridges in life sciences 13th Annual Scientific Conference (11-15 квітня 2018 р., Загреб, Хорватія); 16-ій Українській конференції з космічних досліджень (серпень 2016 р., Одеса, Україна); X Parnas conference young scientist forum "Molecules

in the Living Cell and Innovative Medicine" (10-12 липня 2016 р., Вроцлав, Польща); Науковій Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016» (26-27 травня 2016 р., Київ, Україна); RECOOP HST association, Bridges in life sciences 11th annual scientific conference (7-10 квітня 2016 р., Прага, Чехія); Звітній науковій сесії цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва» (10 грудня 2015 р., Київ, Україна); 15-ій Українській конференції з космічних досліджень (24-28 серпня 2015 р., Одеса, Україна); Науковій Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015» (23-24 квітня 2015 р., Київ, Україна); 11-му Українському біохімічному з'їзді (6-10 жовтня 2014 р., Київ, Україна).

Публікації. За результатами проведеної роботи опубліковано 8 статей у фахових журналах, у тому числі 4 статті Q1 та Q2 квартилів у базі даних SCOPUS, а також 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 222 посилання. Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках, містить 25 рисунків та 4 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГАМК-ЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ ТА ЇЇ УЧАСТЬ У РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ МОЗКУ

1.1.1. Характеристика ГАМК-ергічної системи

Не менше третини (до 50%) синапсів головного мозку використовують в якості медіатора гама-аміномасляну кислоту (ГАМК). ГАМК синтезується з глутамату за допомогою ферменту L-глутамат-декарбоксилази (ГАД). Початково наявність ГАД вважалась ознакою гальмівного нейрону, але останнім часом цей фермент було знайдено і в збуджувальних нервових клітинах. Метаболізується ГАМК за допомогою ферменту ГАМК-трансамінази (ГАМК-Т) в ГАМК-шунті. На відміну від ГАД, ГАМК-Т, що локалізована на мітохондріальній матриці, синтезується не лише в ЦНС, а й в інших органах. ГАМК-Т перетворює ГАМК в сукцинатний напівальдегід, використовуючи α-кетоглутарат в якості акцептору аміногрупи при формуванні глутамату. Для роботи ГАМК-Т необхідна наявність пірідоксальфосфату, що відіграє роль коферменту [19]. Утворений на попередньо описаній стадії метаболізму ГАМК сукцинатний напівальдегід потім оксидизується до сукцинату, який, у свою чергу, залучається до циклу трикарбонових кислот [20].

В апараті Гольджі соми нейрону формуються мембранні утворення у вигляді пухирців, або ж везикул, ще не заповнених медіатором. Ці везикули направляються до пресинаптичного закінчення за допомогою системи швидкого аксонного транспорту. У пресинаптичному закінченні везикули заповнюються медіаторами із залученням АТФ-залежного протонного насосу. Молекули протонної АТФази входять до складу мембрани

синаптичних везикул і підтримують певний рівень мембранного потенціалу. Мембрана синаптичної везикули містить також Ca^{2+}-АТФазу, яка стимулюється кальмодуліном, що забезпечує поглинання везикулами йонів Ca^{2+} [21]. Позаклітинні йони Ca^{2+} беруть участь у механізмах, які сприяють підвищенню ймовірності виділення квантів медіатора [22]. При цьому Ca^{2+} викликає виділення і АТФ, хромогланіну, розчинних білків і тощо [21].

Хімічні синапси ГАМК-ергічних нейронів містять везикули із спеціальними системами хімічного транспорту ГАМК, завдяки яким концентрація ГАМК всередині везикул в 10-20 більша, ніж в цитоплазмі. Після деполяризації мембрани нейрону відбувається злиття цих везикул з пресинаптичною мембраною, регульоване великою кількістю специфічних ферментів (синаптін, неурексини, синаптотагмін, синтаксин, синаптофізин), які активуються у відповідь на зростання внутрішньоклітинної концентрації йонів Ca^{2+}. Іони кальцію потрапляють в пресинапс через кальцієві канали, що відкриваються при деполяризації мембрани нейрону. Загалом, цей процес призводить до вивільнення ГАМК в синаптичну щілину, після чого вона активує різні типи ГАМК-рецепторів, розташованих на пре- та постсинаптичній мембрані [23, 24].

На додаток до везикулярного, вивільнення ГАМК може відбуватись також в процесі роботи в зворотньому напрямку мембранних систем ГАМК-транспорту. Цей процес має набагато більш розпливчасту локалізацію, аніж притаманне строго пресинаптичній мембрані везикулярне вивільнення, є електрично-залежним, тож може бути активованим завдяки деполяризації мембрани при проходженні нервового імпульсу. Іншою важливою рисою процесу невезикулярного вивільнення ГАМК є його незалежність від концентрації іонів кальцію [25].

ГАМК деактивується завдяки поглинанню та перенесенню до пресинаптичної ділянки нейрону, що дозволяє повторно використовувати нейромедіатор, або за рахунок поглинання навколишніми клітинами

нейроглії (астроцитами), де ГАМК трансформується шляхом трансамінації та оксидації до сукцинату. В обох випадках поглинання та транспортування ГАМК здійснюються спеціальними ГАМК-транспортерами, частина яких неспецифічна відносно нервових клітин (тобто є і в нейронах, і в нейроглії), а частина – притаманна тільки нейрогліальним астроцитам [26].

Форми ГАМК-ергічного гальмування досить різноманітні, їх відрізняють один від одного ряд досить специфічних ознак. По-перше, принциповим моментом є те, яка клітина (збуджуюча чи гальмівна) підлягає гальмуванню [27, 28]. Якщо гальмуються ГАМК-ергічні інтернейрони, то кінцевим результатом буде підвищення збудливості нейрональної мережі, що включає у себе ці одиниці. Якщо ж гальмуванню підлягає збуджувальна пірамідна клітина, то це призведить до зниження збудливості відповідної групи нейронів. Крім того, згідно даних нещодавніх досліджень, від типу постсинаптичної клітини певною мірою залежать і модулюючі впливи на пресинаптичну терміналь [29].

По-друге, важливою є ділянка постсинаптичної клітини, на якій знаходяться ГАМК-ергічні синапси. Базуючись на морфологічних та функціональних особливостях ГАМК-ергічних нейронів, можна виділити два основних класи таких одиниць. Перший – це ГАМК-ергічні інтернейрони, аксони яких закінчуються на дендритах клітин-мішеней; наявність іннервації такого типу дозволяє інтернейронам контролювати входи «принципової» клітини, впливаючи на розповсюдження кальцієвих струмів від дендрита до соми. Другий клас – це ГАМК-ергічні інтернейрони, аксони яких селективно проектуються на сому постсинаптичної клітини. Вплив подібних зв’язків контролює генерацію потенціалів дії клітиною-мішенню, впливаючи таким чином на вихід «принципової» клітини [30].

По-третє, ГАМК-ергічні інтернейрони відрізняються за типом кальцієвого струму, який бере участь у вивільненні медіатора (ГАМК) у їх терміналях. Так, інтернейрони у гіпокампальному *str. radiatum* володіють

кальцієвими каналами N-типу, тоді як інтернейрони *str. lucidum* та *str. orience* – каналами Р-типу [31].

Нарешті, окрім «традиційної» квантової синаптичної передачі існує тонічна форма ГАМК-ергічного гальмування. Невеликий, але статистично значущий тонічний струм ГАМК-ергічної природи знайдено у клітинах мозочка [32, 33], кори [34], таламусу [35] і культурі гіпокампальних нейронів [36, 37].

Вищеописані типи гальмування певним чином задіяні у процесах епілептогенезу. За умов моделювання епілепсії на тваринах показано, що в першу чергу розвиток даної патології обумовлює загибель тільки деяких класів інтернейронів [38]. Під час цього процесу відбувається зниження інтенсивності дендритного, але не соматичного гальмування [39].

1.1.2. Роль ГАМК-ергічної системи у розвитку патологій, викликаних перинатальною гіпоксією

ГАМК-ергічна гальмівна нервова передача дуже широко представлена в ЦНС і є принципово важливою для функціонування мозку. Виявлено, що функціональні порушення синтезу та/або метаболізму ГАМК призводять до численних негативних нейрональних ефектів [40]. Уявлення про важливість та роль ГАМК для нормального функціонування мозку дає перелік деяких хвороб, спричинених порушенням її метаболізму або порушенням функціонування ГАМК-рецепторів: це епілепсія, ізомнія, хвороба Альцгеймера, шизофренія і таке інше [41].

Існують тяжкі хвороби, викликані занадто великим вивільненням глутамату в синапс [42], що характерно для епілепсії. Надлишок глутамату в синапсі призводить до перезбудження мозку навіть до розвитку тяжкого судомного нападу. За умов ішемії (порушення кровопостачання) ГМ у синапс виділяється так багато глутамату, що він викликає надмірне накопичення

йонів Ca^{2+} у постсинаптичному нейроні та його пошкодження (нейротоксична дія) – виникає інсульт. Людина може стати інвалідом через погіршення інтелекту, порушення мови чи поганої роботи кінцівок [43].

Зв'язування ГАМК з йонотропними ГАМК-А-рецепторами (субодиницями хлоридних каналів) призводить до їх відкриття і швидкого надходження у постсинаптичний нейрон йонів Cl^-. Ці йони викликають гіперполяризацію (збільшення від'ємного заряду на внутрішній стороні плазматичної мембрани) і в результаті – гальмування функцій нейрона. Гальмування таке ж необхідне для всіх функцій ГМ, як і збудження. По суті, найголовніше для мозку – це не концентрація та дія одного медіатора, а баланс збуджувальних та гальмівних регуляторів [44].

Більшість протиепілептичних лікарських засобів так чи інакше стимулюють ГАМК-ергічну систему, і це дозволяє відновити баланс збудження і гальмування у ГМ. Серед таких засобів існують речовини, які, зокрема, активують ГАМК-А-рецептори – це барбітурати (фенобарбітал) та бензодіазепіни (діазепам), вони володіють заспокійливою (транквілізатори), снодійною та навіть наркотичною дією [45].

Іншим прикладом антиепілептичної/антигіпоксичної терапії є широковідомий препарат пірацетам. Пірацетам – ноотропний лікарський засіб, є похідним ГАМК, належить до класу рацетамів. Використовується для покращення обмінних процесів у корі ГМ. В результаті дії препарату підвищується концентрація АТФ у тканинах мозку, посилюється біосинтез рибонуклеїнової кислоти та фосфоліпідів, стимулюються гліколітичні процеси. Пірацетам позитивно впливає на обмінні процеси і кровообіг мозку, він стимулює окисно-відновні процеси, посилює утилізацію глюкози, покращує регіонарний кровотік в ішемізованих ділянках мозку [46]. Препарат збільшує енергетичний потенціал організму за рахунок прискорення обміну АТФ, підвищення активності аденілатциклази та інгібування нуклеотидфосфатази. Покращення енергетичних процесів під

впливом пірацетаму призводить до підвищення стійкості тканин мозку під час гіпоксії [47].

Отже, схильність до судомної активності внаслідок гіпоксії є результатом дисбалансу між гальмуванням та збудженням, а оскільки ГАМК-ергічна система займає близько 50% нейронів мозку, зміни саме в даній системі відіграють вагому роль у процесі епілептогенезу. Тому важливим є вивчення особливостей функціонування ГАМК-ергічної системи, зокрема роботи ГАМК-транспортерів як ключових регуляторів тонічного гальмування, за умов патології, викликаної перинатальною гіпоксією.

1.2. БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ВИНИКНЕННЯ ЕПІЛЕПТИЧНОЇ ХВОРОБИ

Епілепсія – хронічне захворювання головного мозку (ГМ), що характеризується періодичними нападами, які виникають у результаті надмірної нейрональної активності та супроводжується різними клінічними проявами [48].

В основі епілепсії лежить підвищена нейрональна активність з високовольтними гіперсинхронними розрядами (епілептичний осередок). Найчастіше епілептичні напади зустрічаються у дитячому віці. Напади у дітей характеризуються не тільки високою частотою, але і більшим ступенем прояву [49]. Саме в період, коли йде інтенсивний розвиток мозку, напади можуть призвести до вторинних змін психіки дитини [50].

Причини розвитку епілептичної активності в ГМ недостатньо з’ясовані, але передбачають, що вони пов’язані з будовою мембрани клітин мозку, а також хімічними особливостями цих клітин. Складну гаму причин епілептичних нападів неможна звести до якого-небудь одного фактора.

Відомо, що повторювані епілептичні напади супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин у головному мозку та значними

дисгемічними порушеннями [51]. Локальна тканинна гіпоксія під час судом призводить до надлишкового викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій, посиленню ексайтотоксичних ефектів, перезбудженню і пошкодженню глутаматних рецепторів, стимуляції вільнорадикального окиснення з накопиченням продуктів перекисного окислнення ліпідів [52].

Утворення активних форм кисню стимулює синтез протизапальних цитокінів, що залучаються у каскад апоптичних процесів під час епілепсії. Епілептична активність супроводжується різким підвищенням вмісту вільних жирних кислот у корі мозку, а також зміною вмісту деяких фосфоліпідів [53].

Встановлено, що при епілепсії порушуються процеси синтезу нейромедіаторів. Виявлено порушення обміну електролітів і розподіл іонів на біологічних мембранах, збільшення кількості позаклітинного калію і внутрішньоклітинного кальцію. Посилене вивільнення лактату під час гіпоксії призводить до метаболічного лактатацидозу [52].

Власне, схильність до судомної активності внаслідок гіпоксії є результатом дисбалансу між гальмуванням та збудженням, а оскільки ГАМК-ергічна система займає близько 50% нейронів мозку, то зміни саме в даній системі відіграють вагому роль у процесі епілептогенезу. І саме транспортери ГАМК є ключовими регуляторами тонічного гальмування.

1.2.1. Причини епілепсії

Над причинами епілепсії у різні часи замислювались багато великих людей: «Причиною цієї хвороби, як і інших великих хвороб, є мозок», – наголошував Гіппократ; «Навряд чи існує таке ураження головного мозку, яке не могло б за відомих умов викликати епілепсію», – міркував Д. Кольє.

Незалежно від етнічних і географічних ознак епілепсія зустрічається у 1-2 % людей. Однак судомні стани бувають набагато частіше. Приблизно 5 % людей мають у своєму житті хоч один епілептичний напад. Ці стани

настають внаслідок дії факторів, що їх провокують: наприклад, за високої температури; під час довгого хронічного алкоголізму – судомні абстинентні напади; або за умов хронічної наркоманії – судоми, викликані дефіцитом наркотиків. Звідси висновок, що 20 % всіх людей, які в своєму житті мали хоча б один судомний напад, захворіють на епілепсію [54].

Приблизно у 75 % людей з епілепсією напади з'явились під час перших 20 років життя, серед яких: протягом перших двох років життя – 17 %, дошкільний вік – 13 %, ранній шкільний вік – 34 %, підлітковий вік – 13 %, після 20 років життя – 16 %, середній і старший вік – 2-5 % [55].

Клінічна картина епілепсії у дітей має деякі характерні особливості. До них належить поліморфізм і вікова трансформація нападів, висока питома вага, частота абортивних форм, наявність синдромів, що не зустрічаються у дорослих, нерідко розвиваються післянападові симптоми осередкового ураження мозку [54, 56, 57].

У дітей різні судомні стани зустрічаються у 5-10 разів частіше, ніж у дорослих, що, вочевидь, пов'язано з особливостями будови і функцій ГМ, з напруженістю і недосконалістю регуляції метаболізму, лабільністю та тенденцією до іррадіації збудження, з підвищеною проникністю судин, гідрофільністю мозку та ін. [56].

У походженні епілепсії основну роль відіграють взаємодія спадкової схильності і ураження ГМ. У більшості форм епілепсії виділяється полігенна спадковість. До факторів, що також спричиняють дане захворювання, належать органічні церебральні дефекти перинатального чи набутого (після нейроінфекцій або черепно-мозкової травми) характеру [54].

За досить сильних впливів епілептична активність, як один із способів реакції клітин ГМ, може з’явитися у будь-якої людини. Однак, у "здорових" людей для цього необхідний дуже сильний вплив – наприклад, алкогольна абстиненція чи тяжка черепно-мозкова травма. У маленьких дітей здатність клітин ГМ реагувати надмірним збудженням на подразнюючий фактор більш

виражена, ніж у дорослих, тому за високої температури у них може розвинутись епілептичний напад. Близько у 1-2 % людей активність клітин ГМ настільки велика, що епілептичні напади виникають спонтанно, без наявних причин [56].

Патогенез епілепсії включає ряд механізмів. Це передусім фокальність, яка характерна не тільки для парціальної епілепсії, але і для первинно генералізованих нападів. Найчастіше генералізовані напади виникають при вогнищевих ураженнях медіобазальної скроневої та орбітофронтальної локалізації. У міру прогресування хвороби формується епілептична система і процес поширюється на весь мозок [57].

Біохімічні механізми епілепсії пов'язані з розладом йонних, медіаторних та енергетичних процесів [58]. Так, йонні зсуви ведуть до підвищення мембранної проникності та посилення в результаті цього деполяризації нейронів, їх надзбуджуваності. Зниження запасів глюкози і накопичення молочної кислоти у тканині головного мозку під час нападу є причиною ацидотичних зсувів, які посилюють гіпоксію та знижують рівень фосфатних сполук. Перед нападом часто виявляється метаболічний алкалоз. Мають значення також імунологічні реакції з утворенням під час повторних нападів антимозкових антитіл, циркуляторні розлади та інші фактори, що поширюють зону ураження. Специфічних патологоанатомічних змін під час епілепсії не виявляють. Разом з тим епілептичний процес може викликати тяжкі дистрофічні зміни і зменшення кількості гангліозних клітин, прогресуючий гліоз [59].

Розлади ЦНС, зокрема й епілепсія, спостерігаються і за дефіциту тіаміну [60]. Їх традиційно пов’язують зі зменшенням синтезу АТФ через недостатню функцію тіаміндифосфат-залежних ферментів, що беруть участь у деградації глюкози. Однак ряд даних свідчить про те, що поряд із коферментною функцією дифосфорильованого похідного тіаміну – тіаміндифосфату, тіамін регулює проведення сигналу у нервовій тканині, а

його трифосфорильоване похідне та тіамін-АТФ є сигнальними молекулами, що регулюють енергетичний метаболізм і життєздатність клітин. Хоча механізми цієї регуляторної дії тіаміну та похідних не розшифровані, у синаптосомах показані координовані зміни синтезу ацетилхоліну та активності піруватдегідрогенази під дією тіаміну та його каталітично не активних аналогів. За цими даними можна передбачити, що сигнальна функція тіаміну і похідних включає координовану регуляцію цими сполуками тіаміндифосфат-залежних ферментативних активностей у синапсі. Дегідрогенази пірувату та 2-оксоглутарату, з однієї сторони, деградують 2-оксокислоти, продукуючи НАДН, таким чином визначають енергетизацію мітохондрій та синтез АТФ. З іншої сторони, вони займають ключове положення у синтезі нейромедіаторів. Так, піруватдегідрогеназа постачає ацетил-КоА для синтезу ацетилхоліну, а 2-оксоглутаратдегідрогеназа контролює деградацію безпосереднього попередника нейромедіатора глутамату. Активність обох дегідрогеназ знижена за тіамінового дефіциту та нейродегенеративних захворювань [53].

Таким чином, причини розвитку епілептичної активності в ГМ, на жаль, поки що недостатньо з’ясовані, але передбачають, що вони пов’язані з будовою мембрани клітин мозку, а також хімічними особливостями цих клітин. Складну гаму причин епілептичних нападів важко звести до якого-небудь одного фактора. Приблизно у 70% випадків причина нападів залишається невідомою, не зважаючи на спеціалізоване неврологічне обстеження, оскільки відсутні наявні чи передбачувані ознаки основного захворювання мозку [55]. Залежно від того, у якому віці з’явились напади, варто передбачувати ті чи інші причини. Якщо вони з’явились до 20 років, то причиною скоріш за все може бути пошкодження мозку під час вагітності і пологів, ніж, наприклад, пухлина мозку. Якщо епілепсія настала після 25 років, то найчастіше причиною, як правило, бувають пухлини ГМ, а у похилих людей – порушення кровообігу мозку (інсульти). Встановлено, що

причиною вогнищевих нападів набагато частіше буває первинне порушення функції однієї або декількох ділянок ГМ, ніж генералізованих [59]. Однак, за будь-яких нападів необхідно проводити ретельне обстеження та встановлювати причину, що їх викликає.

1.2.2. Метаболічні порушення при перинатальних ускладненнях

Перинатальні ускладнення є основною причиною судом у дітей [61]. Травми як пологові, так і передпологові, викликають гіпоксію мозку (кисневе голодування мозку) [62]. Справді, більшість вроджених порушень роботи мозку пов’язана з його кисневим голодуванням. Деякі експерти вважають, що 20% випадків епілепсії підпадають під цю категорію [57].

Кисень для будь-якої клітини, особливо для нейрона, є головним енергоакцептором у дихальному мітохондріальному ланцюгу. Зв'язуючись з атомом заліза цитохромоксидази, молекула кисню підлягає чотирьохелектронному відновленню і перетворюється на воду. Але в умовах порушення енергоутворюючих процесів дисбаланс енергетичного метаболізму може негативно відобразитись на клітині і навіть призвести до її загибелі. Головною причиною негативних наслідків цих порушень є утворення при неповному відновленні кисню високореакційних, а тому токсичних, вільних радикалів або ж продуктів, які їх генерують, що обумовлює формування п'ятої стадії «ішемічного каскаду», яка характеризується підвищеним синтезом NO, генерацією активних форм кисню, активацією вільнорадикальних процесів з розвитком оксидативного стресу. В результаті цього відбувається руйнування мембран, порушується проникність, вивільняється надлишкова енергія, що, в свою чергу, веде до руйнування клітини [62].

Відомо, що повторювані епілептичні напади супроводжуються стійкими порушеннями обміну речовин у головному мозку та значними

дисгемічними порушеннями [59]. Локальна тканинна гіпоксія під час судом призводить до надлишкового викиду глутамату, запуску ряду нейрохімічних реакцій, посиленню ексайтотоксичних ефектів, перезбудженню і пошкодженню глутаматних рецепторів. Так, під час вивчення показників оксидантно-антиоксидантної системи у сироватці крові у хворих з епілептичними тоніко-клонічними судомами, виявили стимуляцію вільно-радикального окиснення з накопиченням продуктів перекисного окислнення ліпідів [58]. Утворення активних форм кисню стимулює синтез протизапальних цитокінів, що залучаються у каскад апоптичних процесів під час епілепсії.

В той же час пошкодження мембрани нейрона чи порушення його метаболізму призводять до зміни його чутливості і підвищенню нейронної збудливості. Полярність мембрани нейронів підтримується за рахунок діяльності йонної помпи, яка потребує адекватного енергетичного забезпечення, у з'вязку з цим тенденція до деполяризації мембран нейронів, у тому числі пароксизмальний деполяризаційний зсув мембранного потенціалу, може посилюватися під час розладу метаболічної генерації енергії. Цей процес певною мірою пов'язаний з виникненням та прогресуванням дизбалансу між обмеженими можливостями кровопостачання і підвищеною енергетичною потребою під час судом [57].

1.2.3. Біохімічні аспекти гіпоксичного ураження головного мозку

Перша кваліфікація гіпоксичних станів була опублікована V.Barcroft в 1925 р. Згідно з цією класифікацією виділяли гіпоксію гіпоксичного, анемічного та циркуляторного походження. В наступні роки ця класифікація була лише незначно доповнена і уточнена. В основу сучасної кваліфікації гіпоксії покладено причини і механізми її розвитку. Розрізняють наступні її види: гіпоксичну, дихальну, гемічну, циркуляторну, тканинну, змішану [63].

Гіпоксична (екзогенна) гіпоксія розвивається при зниженні парціального тиску кисню у повітрі, яке вдихається, і виникає головним чином при підйомі на висоту, де атмосфера розріджена. Її можна відтворити в експериментах шляхом викачування повітря з барокамери, або використання дихальних сумішей, збіднених на кисень [64].

В реакції організму на гіпоксію виділяють дві стадії – компенсації і декомпенсації. У стадії компенсації завдяки компенсаторно-пристосувальним реакціям підтримується нормальне постачання тканин киснем. При виснаженні пристосувальних механізмів розвивається стадія декомпенсації. Компенсаторно-пристосувальні реакції включаються шляхом рефлекторного посилення дихання, кровообігу, а також шляхом посилення транспорту кисню і змін тканинного обміну [65].

Тканинними компенсаторними механізмами є: посилення здатності тканинних ферментів утилізувати кисень з крові, підтримувати досить високий рівень окисних процесів і здійснювати нормальний синтез АТФ всупереч гіпоксії; більш ефективне використання енергії окисних процесів за рахунок посилення спряженості процесів окиснення і фосфорилювання; посилення процесів безкисневого звільнення енергії за допомогою гліколізу [66]. Якщо компенсаторно-пристосувальні механізми не перекривають гіпоксії, розвивається киснева недостатність. Нестача кисню призводить до енергетичного голодування тканин, що лежить в основі всіх порушень при гіпоксії.

Першим важливим механізмом запуску ішемічного каскаду являється зниження мозкового кровотоку з розвитком дефіциту кисню і, як наслідок, дефіциту енергії. В аеробних умовах (за достатнього рівня кисню, що забезпечується адекватним кровопостачанням) продукти гліколізу, окиснення жирних кислот та амінокислот окислюються за участі кисню у дихальному ланцюгу мітохондрій у циклі Кребса [46]. Саме мітохондрії виконують роль основного джерела енергії, яка акумулюється у вигляді

трансмембранного потенціалу і АТФ, причому окиснення однієї молекули глюкози дає 38 молекул АТФ. Робота циклу Кребса в нормі доповнюється цілим рядом шунтів, стимулюючих окиснення окремих енергосубстратів. Так, сукцинат активно окиснюється у циклі Робертса, внутрішньомембранні ліпіди окиснюються з утворенням фосфатидилхоліну в циклі Кенеді, ресинтез глюкози з лактату іде в циклі Корі, а окиснення жирних кислот відбувається у циклі бета-окиснення [47].

За умов ішемії, тобто в умовах нестачі перфузії і, як наслідок, кисню, що надходить у мозок, отримання енергії здійснюється шляхом анаеробного гліколізу, реакції якого закінчуються утворенням тільки 2 молекул АТФ і накопиченням лактату [52]. На початковому етапі церебральної ішемії будь-якої етіології у мітохондріях знижується швидкість аеробного окиснення. Це призводить до зниження кількості АТФ і зростання вмісту аденозиндифосфату (АДФ) і аденозинмонофосфату (АМФ) і, як наслідок, до зниження коефіцієнту АТФ/АДФ+АМФ. За низького співвідношення АТФ/АДФ+АМФ активується фермент фосфофруктокіназа (ФФК), що дозволяє різко збільшити пропускну здатність реакцій анаеробного гліколізу. Клітина використовує глікоген, забезпечуючи себе енергією за рахунок безкисневого розпаду глюкози. На цьому етапі ще може відбуватися адаптація до гіпоксії і стабілізація енергообміну. Однак така стабілізація супроводжується виснаженням запасів глікогену [67].

Енергетичний статус клітини за умов гіпоксії має велике значення для підтримання життєво важливих функцій, таких як: електрогенна, скоротлива, терморегуляторна, транспортна, обмінна, а також для підтримки осмотичної рівноваги, синтетичних процесів та ін. Рецепторна функція клітини також є енергозалежним процесом [68]. Енергозалежними є синтез багатоьх нейромедіаторів; конформаційні зміни молекул рецепторів; зв’язування нейромедіатора з рецептором; передача імпульсу; підтримання активності транспортно-катіонних мембранних АТФаз; етапи фосфорилювання, що

стимулюють швидкість обміну Na^+ та Ca^{2+} через плазматичну мембрану; внутрішньоклітинна секвестрація кальцію; активація аденілатної активності та утворення циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) [69]. За даними Gao, 2022, цАМФ включається як проміжна ланка у передачі інформації через пептидні, гормональні та опіатні рецептори [70]. Власне АТФ бере участь у трьох послідовних процесах: 1) деполяризація мембран, що супроводжується інактивацією Na^+,K^+-АТФази та локальним збільшенням вмісту АТФ; 2) секреція медіаторів, за якої спостерігається активація АТФази та підвищене використання АТФ; 3) витрачання АТФ, що компенсаторно включається у систему його ресинтезу, необхідного для реполяризації мембран, видалення Ca^{2+} з терміналей нейронів, відновлювальних процесів у синапсах [71].

Зниження вмісту АТФ за умов гіпоксії перш за все порушує енергозалежний процес фосфорилювання-дефосфорилювання мембранних білків та ліпідів, який забезпечує структурну цілісність мембран. Це призводить до активації ендогенних фосфоліпаз і розпаду, а також до втрати мембранних фосфоліпідів, збільшенню плинності мембран та їх проникності. У результаті відбувається вихід з клітини K^+ і деяких ферментів, вхід у неї Ca^{2+}, а також падіння мембранного потенціалу. Все це не може не впливати на структурно-конформаційний стан рецепторів та їх функцію [64].

Церебральна гіпоксія дуже рідко буває локальним процесом, так як депресія регуляторно-трофічних функцій нервової системи за рахунок місцевого чи дифузного нейронального пошкодження швидко веде до системних розладів [52].

На системному рівні гіпоксія провокує розвиток стресу, а гормони стресу – катехоламіни і глюкокортикоїди – посилюють гліколіз, глікогеноліз, глюконеогенез і транспорт екзогенної глюкози до найбільш життєво важливих органів і тканини [72-74]. Ціна даної адаптації є високою не тільки внаслідок меншої енергетичної ефективності анаеробного шляху порівняно з

аеробним. Кінцевим продуктом гліколізу є лактат, зростання якого провокує внутрішньоклітинний ацидоз [75-78].

На ранніх етапах ішемії клітинний ацидоз можна розглядати у якості захисної реакції, бо зниження pH виявляє стабілізуючу дію на клітинні мембрани. Однак прогресування ацидозу викликає денатурацію деяких білків і формування у цитоплазмі зерен, що проявляється помутнінням цитоплазми («мутне набухання», «зерниста дистрофія») [79-82]. В міру його наростання сповільнюється інтенсивність обміну фосфопротеїнів і фосфоліпідів, знижується вміст в сироватці основних амінокислот, збільшується вміст в тканинах аміаку виникає негативний азотистий баланс[83]. Порушується ліпідний обмін, накопичується його продукти – кетонові тіла (ацетон, ацетооцтова і гідроксимасляна кислоти), рівень яких в сечі і крові зростає [84-86]. Нагромаджуються продукти перекисного окиснення ліпідів, що призводить до пошкодження клітинних мембран та їх органоїдів [87].

Порушуються обмін електролітів і перш за все процес активного переміщення і розподілу іонів на біологічних мембранах. Збільшується кількість позаклітинного калію і внутрішньоклітинного кальцію [88, 89].

Порушуються процеси синтезу медіаторів нервової системи. Посилене вивільнення лактату під час гіпоксії дає метаболічний лактатацидоз, який блокує активність ФФК, що лімітує адаптацію [90]. На цій стадії гіпоксії у клітині формується справжній дефіцит АТФ, оскільки аєробний механізм не працює через кисневий дефіцит, а анаеробний – через ацидоз [91-95].

Найбільші проблеми виникають у головних клітинних споживачів енергії – градієнтстворюючих і скоротливих систем клітини. Найбільш енергоємним ферментом у клітинах є Na^+, K^+-АТФаза [96, 97]. Дефіцит енергії не дає цьому ферменту нормально працювати, що проявляється втратою калій-натрієвого градієнту. В результаті клітини втрачають йони калію, а у позаклітинному середовищі виникає його надлишок. Часткова втрата потенціалу спокою робить клітини менш збуджуваними.

Найважливішим з прямих наслідків пошкодження калій-натрієвої помпи є проникнення у клітину надлишку натрію, який стимулює гіпергідратацію та церебральний набряк [98, 99].

На другій стадії ішемічного каскаду через 10-30 хв з моменту його виникнення вібувається викид глутамату з розвитком глутаматної «ексайтотоксичності». Глутамат є основним збуджуючим нейротрансмітером ЦНС, бере участь у здійсненні когнітивних функцій, поряд з ацетилхоліном подтримує рівень неспання, але за високих концентрацій є нейротоксином. Він реалізує свої ефекти через групу йонотропних мембранних рецепторів-каналів: NMDA, AMPA, каїнатних рецепторів [100-103].

Збудження глутаматних NMDA-рецепторів, що регулюють вміст K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^- у поза- та внутрішньоклітинному просторі, активує Са-канали, що призводить до посилення надходження позаклітинного Ca^{2+} у клітину і звільненню внутрішньоклітинного Ca^{2+} з депо, що активізує різні ферментативні системи. Це призводить до порушення фосфорилювання білків, розщеплення фосфоліпідів і вивільнення арахідонової кислоти, виходу Ca^{2+} з депо, утворення токсичних продуктів, вільних радикалів, що виявляють цитотоксичну, імуногенну та мутагенну дію, яка пошкоджує клітинну ДНК і РНК [104-107].

Поряд з набуханням мітохондрій, обумовленим проникненням у них калію, фосфату і води, процес переноситься у цитоплазму клітини і виходить на міжклітинний рівень, що робить гіпоксію тканинною. Ця стадія ішемічного каскаду вже не може бути повернена шляхом відновлення притоку кисню або реперфузією, за рахунок того, що глибоко пошкоджені мітохондрії перестають бути акцепторами кисню і субстратів; сполучаючись у цитоплазмі з натрієм та кальцієм, вони формують ендогенні мила, які розчиняють (змивають) ліпідні мембрани [108-111].

За гіпоксії проявляються нові властивості аденінових нуклеотидів як ендогенних внутрішньоклітинних і міжклітинних регуляторів метаболізму,

функція яких спрямована на захист клітин від гіпоксії. Таким чином, аденінові нуклеотиди в умовах гіпоксії не тільки виступають у ролі регуляторів рецепторної функції, але і активно впливають на метаболічний статус клітини, проявляючи при цьому антигіпоксичні властивості. Поряд з тим в останні роки з'являються дані про те, що енергетичний обмін знаходиться під гормональним контролем [112-116].

Епілептична активність супроводжується різким підвищенням вмісту вільних жирних кислот у корі мозку, а також зміною вмісту деяких фосфоліпідів. Внаслідок гідролізу мембранних ліпідів та звільнення вільних жирних кислот і диацилгліцеролів, змінюються деякі властивості нейронних мембран, наприклад, мікров'язкість, провідність йонних каналів, активність мембранозв'язанх ферментів [117-123].

Паралельно з біохімічними виникають й значні структурні порушення клітин. Інтенсивність обміну речовин, потужність гліколітичної системи та запаси аденілових нуклеотидів у тканинах визначають їх неоднакову чутливість до нестачі кисню. З огляду на це, найчутливішою до гіпоксії є нервова система. Показником кисневої недостатності головного мозку в початкових стадіях є ейфорія, яка характеризується емоційним і руховим збудженням і неадекватністю поведінки. В основі її лежить порушення процесів внутрішнього гальмування. При наростанні гіпоксії розвивається гальмування, сонливість, порушується рефлекторна діяльність, регуляція дихання і кровообігу, координація рухів. В кінці виникає втрата свідомості, корчі, смерть від зупинки дихального центру [124-126].

1.3. ТРАНСПОТЕРИ ГАМК: ЛОКАЛІЗАЦІЯ, ТИПИ, ВЛАСТИВОСТІ ТА РОЛЬ У РОЗВИТКУ НЕЙРОПАТОЛОГІЙ

Система транспорту ГАМК, що забезпечує регуляцію позаклітинної концентрації ГАМК і нового використання вивільненого з нервових терміналей медіатора, охарактеризована як *in vivo*, так і на зрізах мозку, культурах нейрональных клітин і синаптосомах.

Дотепер клоновано чотири типи переносників ГАМК: GAT1, GAT2, GAT3, BGT1-betaine-GABA transporter1 (у номенклатурі для мишей: GAT1, GAT2, GAT3 та GAT4), які різняться локалізацією, афінністю до ГАМК і чутливістю до інгібіторів [7, 25, 127-135]. Домінуючими типами, що експресуються в нейрональных клітинах, є GAT1 і GAT3. Саме ці транспортери розглядають як основні регулятори концентрації позаклітинної ГАМК у тканині мозку. Експресія GAT2 показана, в основному, у клітинах мозкових оболонок, а BGT1, крім нейрональних клітин, знайдений у клітинах нирок та печінки [7, 25].

Транспортери GAT-1 і -3 експресуються у корі ГМ: перші – у мембранах терміналей аксонів та мембранах астроцитів, другі – лише в астроцитах [136]. Дослідження кіркового розподілу, клатинної локалізації, онтогенезу і взаємодії GATs з елементами релізингу ГАМК із застосуванням різних світлових та електронно-мікроскопічних методів та імуноцитохімії показали, що: 1) GATs стратегічно розташовані, щоб безпосередньо поглинати ГАМК під час швидкого синаптичного гальмування, припиняючи дію ГАМК та формуючи гальмівні постсинаптичні відповіді; 2), частина GATs можуть брати участь у таких функціях, як регулювання дифузії ГАМК до сусідніх синапсів і регулювання рівня ГАМК в спинномозковій рідині; 3) GATs можуть відігравати важливу роль у складних процесах регулювання дозрівання кортексу; 4), GATs сприяють регуляції збудливості нейронів, яка супроводжує мінімум два основних захворювання людини: епілепсію та

ішемію [25]. GATs гіпокампу також представлені GAT1, що експресуються на пресинаптичних мембранах, та GAT3, що представлений на мембранах астроцитів [126].

Транспортери глутамату і ГАМК відіграють важливу роль у якості регулятора позаклітинної концентрації цих амінокислот. При цьому в залежності від стану нервової тканини у локальній ділянці вони можуть як обмежувати дифузію (поглинання), так і бути джерелом дифузного сигналау (обернено спрямоване поглинання). Нейромедіатор може вивільнятися у позаклітинний простір під час осмотичного стресу. Зміни осмотичного тиску на клітинну мембрану можуть відбуватися як у випадку високої нейрональної активності, так і за умов пошкодження мозку (травма, гіпоксія-ішемія). Клітинам необхідно підтримувати постійний об'єм. А під час його змін за умов осмотичного стресу у них починає синтезуватися ряд білків (субодиниць каналів, транспортерів та складових метаболічних шляхів), що дозволяють регулювати цей об'єм. Деякі з цих "антиосмотичних" транспортерів та каналів можуть призводити до вивільнення амінокислотних нейротрансмітерів з клітин у позаклітинний простір [130, 137-141]. Відомо також, що активність та щільність розташування на пресинаптичній мембрані та на мембранах глії, що оточує синапс транспортерів ГАМК і глутамату може змінюватися у результаті певних метаболічних процесів (наприклад, фосфорилювання) [137, 142-144].

Поглинання нейротрансмітерів із позаклітинного простору принципово важливе для підтримки ефективності синаптичної передачі сигналу. У цьому процесі беруть участь гліальні та нейрональні транспортери. Клітинний та субклітинний розподіл, біофізичні та фармакологічні властивості транспортерів різняться. На відміну від транспортерів глутамату транспортери ГАМК не специфічні для певного типу клітин. Вважають, що GAT1 і GAT3 є основними транспортерами, що здійснюють поглинання ГАМК, яка вивільняється під час синаптичної активностиі, і знаходяться як у

нейронах, так і у гліальних клітинах. Однак, недивлячись на відсутність явної клітинної специфічності, існує ламінарний розподіл експресії транспортерів. Це призводить до того, що у гіпокампі поглинання ГАМК навколо пірамідних клітин вище, ніж навколо інтернейронів. GAT2, ймовірно, відіграє важливу роль під час розвитку мозку, а у дорослому мозку поряд з BGT1 бере участь у метаболічних процесах. Транспортери ГАМК, за аналогією з транспортерами глутамату здатні переносити нейромедіатор через мембрану в обох напрямках: поглинати з позасинаптичного простору всередину і навпаки – вивільняти. Обернення поглинання ГАМК може спостерігатися під час змін градієнтів іонів натрію, деполяризації мембрани та пригніченні активності ГАМК-трансамінази. In vivo обернення роботи транспортерів ГАМК, таким чином, можливе за високої частоти розрядів клітин та судомах [8, 142, 145-150].

Транспортери ГАМК, локалізовані у плазматичній мембрані пресинаптичних терміналей аксонів та клітин глії, відіграють ключову роль у зниженні позаклітинної концентрації нейромедіатору після його вивільнення до синаптичної щілини і забезпечують рециклінг вивільнених шляхом екзоцитозу молекул нейромедіатору. Процес видалення ГАМК із позаклітинного середовища високоафінними специфічними мембранними транспортерами розглядають як основний механізм термінації процесу гальмування [151]. Трансмембранне перенесення ГАМК відбувається проти концентраційного градієнту: у цитозолі соми нейронів гіпокампу концентрація ГАМК може досягати 6,6 мМ, а позаклітинний рівень дорівнює 0,1–0,8 мкМ [8]. Перенесення однієї молекули медіатору супроводжується одночасною транслокацією двох йонів Na^+ і одного йону Cl^-. Основною рушійною силою переносу ГАМК через плазматичну мембрану є електрохімічний градієнт натрію [130, 142, 152-154].

Варто також зазначити, що ГАМК-система відіграє важливу роль на ранніх етапах розвитку гіпокампу. Зокрема, пік експресії GAT-1

спостерігається у ранньому дитинстві, а також маркерного фермента ГАМК-ергічних нейронів – глутамат-декарбоксилази – під час перинатального періоду. Тому саме дитячий вік є найбільш вразливим до нейродеструктивних порушень у ГМ і, як наслідок, до захворювань ЦНС. До того ж GAT-1 має нейротрофічну функцію і забезпечує відновлення нейронів та їхню пластичність у дитячому віці [155-160].

Погіршення функцій GATs запускає патофізіологічні механізми, що лежать в основі епілептогенезу. Так, експерименти на синаптосомах, виділених з кори головного мозку та гіпокампу з біопсії у хворих скроневою епілепсією (TLE) показали, що накопичення [^{3}H]ГАМК у гіпокампі майже вдвічі менше, ніж у корі [161, 162]. Ці дані додатково підтверджують той аспект, що гіпокамп є найбільш вразливою до гіпоксичного стресу структурою ГМ.

В літературі представлено недостатньо даних щодо системи трансмембранного транспорту ГАМК в таламусі. Відомо тільки, що транспортери у нейронах таламусу мають значно нижчу спорідненість до нейромедіатору порівняно з транспортерами в нейронах кори та гіпокампу. За дослідженнями Liu et al. [163] відомо, що Km поглинання ГАМК для GAT3, що експресується переважно у таламусі, становить 18 мкМ, а для GAT4 ця величина становить 0,8 мкМ. GAT3 також транспортує β-аланін і таурин з Km 28 і 540 мкМ відповідно. Крім того, GAT4 транспортує β-аланін з K_m 99 мкМ і таурин з K_m 1,4 мМ. Експресія мРНК GAT3 у мозку мишей регулюється з розвитком, і його мРНК досить багато у мозку новонароджених, але у мозку дорослого організму порівняно мало. Також виявлено високу спорідненість GAT1 і GAT4 до ГАМК, тому вони є більш чутливими до інгібування, у той час як GAT2 і GAT3 мають низьку спорідненість до ГАМК [164, 165].

Отже, взаємодія гальмівних і збуджувальних систем нейропередачі у ЦНС фактично є базисом для обробки та збереження інформації мозком.

Порушення балансу між цими системами призводить до развитку серйозних патологічних зсувів у ЦНС, зокрема, такі порушення є одним з ключових факторів, відповідальних за розвиток такої хвороби, як епілепсія [166-170].

Протисудомні препарати вибірково пригнічують гліальні, але не нейрональні, ГАМК-транспортери [10, 11, 171-175]. Лише створення чіткої картини молекулярних механізмів, що контролюють ГАМК-транспортери у гліальних клітинах, допоможе розробити коректну хімічну кореляцію багатьох захворювань ЦНС, зокрема і епілепсії.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1.1. Матеріали, реактиви та обладнання

В роботі були використані наступні матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); EDTA, «Calbiochem» (США); фіколл-400, амінооксиоцтова кислота, NO-711, «Sigma» (США); [^{3}H]ГАМК, «Perkin Elmer» (США), сцинтиляційні рідини ACS та OCS «Amersham», (Велика Британія); фільтри GF/C «Whatman» («Sigma», США); інші реактиви категорії х.ч. та ос.ч. були вітчизняного виробництва («Реахім», Україна).

Для приготування водних розчинів, середовища виділення та інших буферів використовували бідистильовану воду.

Було використано такі прилади: центрифуга Mini Spin («Eppendorf», Німеччина), центрифуга Digicen 20R («Alvarez Redondo, S.A.», Іспанія), центрифуга К-23D («MTW», Німеччина), міксер Vortex («VELP Scientifica», Італія), водяна баня WNB 7-45 («Memmert GmbH», Німеччина), лічильник Delta 300 («Tracor Analytic», США), спектрофлуориметр MPF-4 («Hitachi», Японія).

2.1.2. Умови створення експериментальної моделі перинатальної гіпоксії

Експерименти проводили на щурятах 10-12 денного віку, оскільки рівень розвитку головного мозку щурів цього віку відповідає рівню розвитку головного мозку новонародженої дитини. Використовували модель [176], яка імітує гострі судоми та хронічний епілептогенний ефект гіпоксії у немовлят, що спостерігається у клініці. Стан гіпоксії викликали, розміщуючи тварин у

камері з атмосферою, що складалась з 3-4 % кисню і 96 % азоту та утримували протягом 12 хвилин до появи тоніко-клонічних судом. Тварин декапітували через 1, 2, 4 та 8 тижнів після гіпоксичного впливу.

2.1.3. Етичні норми

Всі експерименти були виконані згідно «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Протокол №1 від 19/09-2012).

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Wistar. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію, з вільним доступом до їжі та води, режимом освітлення 12/12 годин, постійною вентиляцією приміщень, температурою повітря 20-25 °С та рівнем вологості 50-60 %.

Модель гіпоксії викликали у щурят 10-12 денного віку. Тварин брали в експеримент через 1, 2, 4 та 8 тижнів після гіпоксичного впливу.

2.1.4. Отримання синаптосом з головного мозку щурів

Гомогенізація мозку призводить до відокремлення синапсів від клітин, при цьому мембрана, що оточувала кожен синапс, замикається в окремий пухирець. В результаті утворюються штучні «синаптичні частинки» (синаптосоми), які можна відокремити центрифугуванням та вивчати в очищеному вигляді [177].

Виділення синаптосом проводили за методом Котмана [178] з незначними модифікаціями [179]. Піддослідних тварин швидко декапітували без наркозу (згідно суворих міжнародних вимог «AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition»), оскільки використання хімічних анестетиків змінює біохімічні показники мозку, що є критично важливим для

дослідження. Швидко діставали мозок. Всі наступні дії виконували за температури 0…+4 °С. Моторну зону кори, гіпокамп і таламус швидко виділяли під мікроскопом; одержані зразки двічі гомогенізували за допомогою скляного гомогенізатора Поттера (зазор 0,2 мм) в охолодженому середовищі виділення наступного складу: 0,32 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0,2 мМ ЕДТА, pH 7,4. Отримані гомогенати центрифугували при 2500 g протягом 5 хв для осадження фракцій великих ядер, зруйнованих фрагментів кровоносних судин, великих фрагментів нервових клітин. Надосадову фракцію центрифугували при 15000 g протягом 12 хв, осаджуючи фракцію неочищених синаптосом – Р2-фракція (мітохондрії, синаптосом, мієлінізовані залишки).

Для одержання очищеної фракції синаптосом попередньо одержаний осад ресуспендували у середовищі виділення та наносили на градієнт фіколлу (у концентраціях 13%, 6% і 4%), який було приготовано на тому ж середовищі, і центрифугували при 70000g 45 хв на бакет-роторі. Фракцію синаптосом, що отримували в інтерфазі між 13% і 6% розчинами фіколлу, збирали, розводили середовищем виділення 1:4 та центрифугували при 15000g 20хв.

Синаптосоми ресуспендували в охолодженому стандартному сольовому розчині (буфер Кребс-Рінгер), наступного складу: 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ NaH_2PO_4, 10 мМ D-глюкоза, 0,1 мМ амінооксиацетат. Буферний розчин весь час насичували киснем.

2.1.5. Визначення концентрації протеїну

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі у модифікації Ларсона [180]. Даний метод поєднує у собі біуретову реакцію (реакцію на пептидні зв’язки) та реакцію Фоліна (на тирозин і триптофан).

Реактив Фоліна розводили водою 1:1. У контрольну пробірку вносили 10 мкл буферного розчину Кребс-Рінгер, у експериментальні – по 10 мкл суспензії синаптосом з отриманих проб. Об'єм кожної проби доводили до 300 мкл 25 мМ NaCl. Далі в кожну пробу вносили по 3 мл реактиву Лоурі С наступного складу: Na_2CO_3, виннокислий тартрат Na, 25 мМ NaOH, 10% $CuSO_4$. Потім одночасно вмикаючи секундомір, вносили по 300 мкл реактиву Фоліна в кожну наступну пробірку через 15-20 с, перемішували міксером Vortex. Через 3 хв у першу пробірку (а потім з інтервалом у 15-20 с у наступні) додавали 20 мМ дитіотреітол (ДТТ) по 300 мкл, перемішуючи.

Оптичну густину кожного розчину вимірювали у спектрофотометрі за довжини хвилі 740 нм. Визначення оптичної густини проводили проти контрольного розчину. Концентрацію протеїну (мг/мл) визначали за формулою (2.1):

$$x = \frac{y}{0{,}0078}, \qquad (2.1)$$

де х – концентрація протеїну, мкг/10 мкл проби;

у – оптична густина;

0,0078 – коефіцієнт, отриманий під час побудови калібрувального графіка.

Вихід протеїну становив 10-12 мг протеїнів синаптосом на 1 г вологої ваги мозку.

2.1.6. Визначення акумуляції [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів

Для визначення акумуляції [^{3}H]ГАМК синаптосомами концентрація білку в пробі становила 100 мкг/мл, концентрація неміченої, "холодної" ГАМК – від 0,5 до 5 мкМ, а [^{3}H]ГАМК – 0,2 мкКі/мл, об'єм проби становив

0,6 мл. Синаптосоми, що були суспендовані у буфері Кребс-Рінгер, інкубували за 37ºС 5 хв, після чого ініціюювали процесс акумуляції внесенням ГАМК, суміші "холодної" і міченої. Через 1 хв аліквоти (0,5 мл) фільтрували через GF/C фільтри, фільтри двічі промивали охолодженим стандартним сольовим розчином, наступного складу: 126 мМ NaCl, 5 мМ KCl; висушивали та вимюрювали рівень радіоактивності у сцинтиляційній рідині OCS (organic counting scintillate) на лічильнику Delta 300 ("Tracor Analytic",США) [181].

2.1.7. Визначення вивільнення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів

Синаптосоми (2 мг протеїну/мл) в оксигенованому стандартному сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інкубували 5 хвилин при 37^{o}C за присутності 5x10^{-7}М (0,1 Кі/мл) [^{3}H]ГАМК. Після охолодження на льоду, суспензію утричі розводили охолодженим сольовим розчином і центрифугували при 4000 g 5 хвилин. Осад суспендували за температури 4^{o}C і концентрації протеїну 1 мг/мл в сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти. Синаптосоми, що акумулювали [^{3}H]ГАМК (1 мг протеїну/мл), негайно використовували для вивчення процесів вивільнення ГАМК. Синаптосоми (120 мкл суспензії) інкубували 10-15 хв за 37^{o}C, після чого центрифугували у мікроцентрифузі Eppendorf (10,000 g, 20 s). Рівень радіоактивності вивільненої [^{3}H]ГАМК в аліквотах супернатанту (90 мкл) вимірювали в лічильнику Delta 300 («Tracor Analytic», США) з використанням сцинтиляційної рідини ACS (aqueous counting scintillate), (1мл на 1 аліквоту). Вміст міченої ГАМК у супернатантах був виражений у відсотках від загального вмісту накопиченої синаптосомами [^{3}H]ГАМК [182].

2.1.8. Оцінка мембранного потенціалу синаптосом

Мембранний потенціал нервових закінчень є одним з основних параметрів, що визначає нормальне транспортер опосередковане поглинання і позаклітинний рівень нейромедіаторів.

Мембранний потенціал ізольованих нервових закінчень вимірювали з використанням флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6G (Rh 6G). Завдяки тому, що цей зонд є ліпофільним та катіонним, він легко проходить крізь цитоплазматичний бар'єр і зосереджується в примембранному просторі клітини, згідно величини його мембранного потенціалу. За цих умов спостерігається гасіння флуоресценції зонду за рахунок часткового зв'язування з від'ємно зарядженим матриксом синаптосом.

Флуоресцентні виміри проводились на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 за довжини хвилі збудження – 528 нм та емісії – 551 нм (ширина щілин – 5 нм). В кювету з магнітною мішалкою до суспензії синаптосом (кінцева концентрація протеїну – 0,15 мг/мл) додавали родамін 6G (кінцева концентрація – 0,5 мкМ) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонду до досягнення стаціонарного значення (F_t). Кількісну оцінку мембранного потенціалу давали, розраховуючи так званий індекс мембранного потенціалу (2.2)

$$F = \frac{F_t}{F_0}, \qquad (2.2)$$

де F_t – інтенсивність флуоресценції Rh 6G за присутності синаптосом;

F_0 – інтенсивність флуоресценції Rh 6G за присутності та за відсутності синаптосом.

Додавання синаптосомальної суспензії до середовища, що містить родамін 6G, супроводжується частковим зниженням флуоресценції за рахунок зв'язування зонда з плазматичною мембраною.

2.1.9. Оцінка стану ацидифікації синаптичних везикул

Стан ацидифікації синаптичних везикул реєстрували спектрофлуориметричним методом за допомогою pH-чутливого флуоресцентного барвника акридинового оранжевого (АО), який здатний накопичуватись у кислих компартментах клітин згідно pH-градієнту. При цьому відбувається гасіння інтенсивності флуоресценції зонду внаслідок його протонуваня в синаптичних пухирцях синаптосом (pH ≈ 5). Кінетику входу АО (кінцева концентрація – 5 мМ) в синаптосоми (кінцева концентрація протеїну – 0,2-0,4 мг/мл) реєстрували протягом 15 хв до досягнення стаціонарного рівня, після чого додавали досліджувані речовини та фіксували новий стаціонарний рівень флуоресценції АО. Досліди проводили на спектрофлуоріметрі Hitachi MPF-4 за довжини хвилі збудження 490 нм та емісії – 530 нм у термостатичній кюветі ($t=30^0$ С) при постійному перемішуванні.

2.1.10. Статистична обробка отриманих результатів

Достовірність міжгрупових відмінностей встановлювали згідно критерію Стьюдента (t) з граничним рівнем $P \leq 0,05$.

Статистичну обробку результатів, побудову графіків і розрахунки функцій проводили з використанням стандартних пакетів прикладних програм Excel, Origin 6 та Origin 8.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Особливості роботи транспортерів ГАМК у корі, таламусі та гіпокампі головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії

Гіпоксія у ранньому віці призводить до хронічного нейрологічного дефіциту, який пов'язаний з порушенням нормальних високорегульованих процесів розвитку мозку і має довготривалі наслідки у дорослому віці.

Враховуючи особливу роль ГАМК для незрілого мозку, наше дослідження перинатальної гіпоксії було зосереджено на процесі поглинання (накопичення) цього нейромедіатора, опосередкованому ГАМК-транспортерами.

Було застосовано модель на тваринах, яка індукує гострі судоми і демонструє віково-залежну епілептогенність гіпоксії. Білі щури-самці перенесли гіпоксію у віці 10-12 днів після народження (цей вік для щурів відповідає доношеній новонародженій дитині). Одним з підходів є створення умов короткострокової (15-20 хв) глобальної гіпоксії шляхом розташування тварин в камерах, де повітряна атмосфера заміщена на газову суміш, що складається з 3-4% кисню і 96% азоту. Такі умови спричиняють у 10-12-добових щурят тоніко-клонічну судомну активність. Крім того, на зрізах гіпокампу 70-80-добових щурят (на 8-9 тижнях після гіпоксії) реєструють гострі та хронічні зміни збудливості нейронів гіпокампу, проте без явних морфологічних змін [52, 64, 183].

У дослідженнях процесу акумуляції ГАМК були використані фракції нервових терміналей (синаптосом), виділені з кори головного мозку, гіпокампу і таламусу контрольних щурів та щурів, які зазнали впливу гіпоксії. Тварин брали в експеримент через 1, 2, 4 та 8 тижнів після гіпоксичного стресу (рис. 3.1).

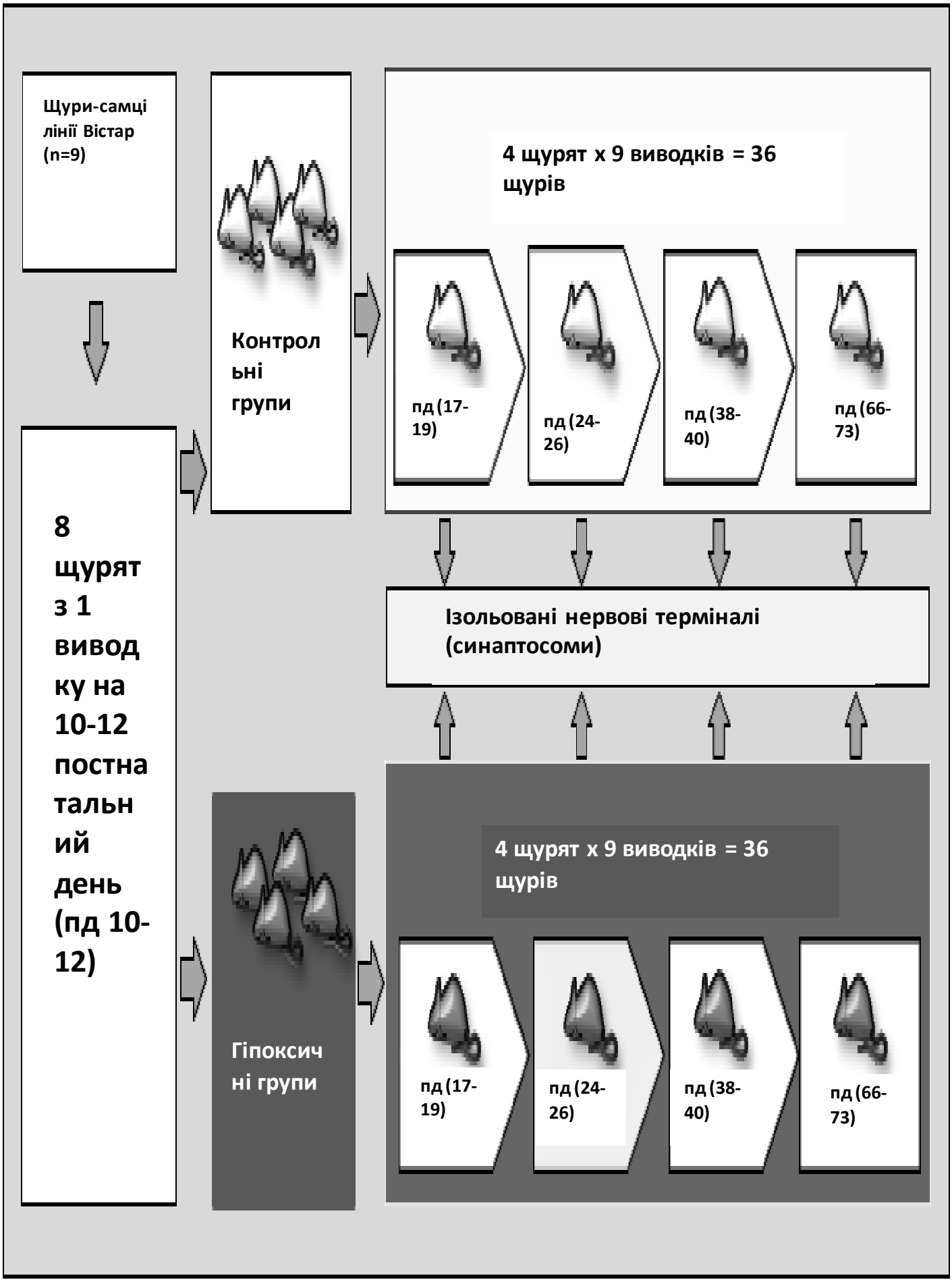
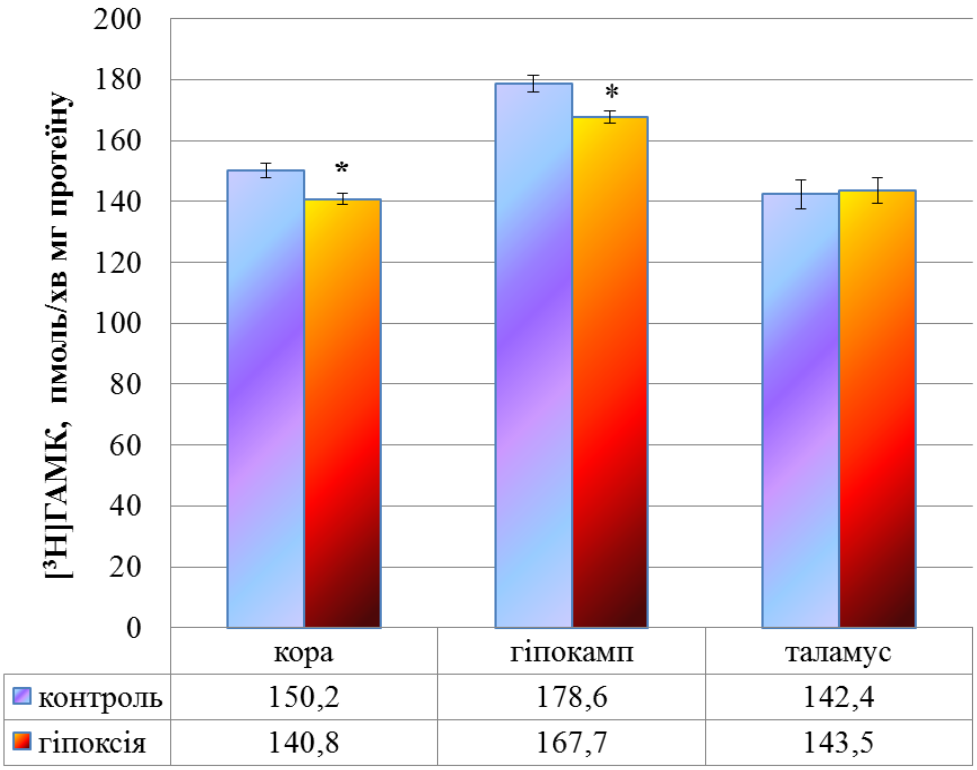


Рис. 3.1. Схема експерименту

Синаптосоми зберігають усі властивості інтактного нервового закінчення щодо забезпечення процесу передачі нервового імпульсу, а саме, здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатори, підтримувати мембранний потенціал та функціональний стан синаптичних везикул. Синаптосоми вважаються однією з найкращих систем для дослідження взаємозв'зку між структурою протеїнів, їх біохімічними та фізіологічними функціями [184].

Вивчення процесу трансмембранного перенесення ГАМК показало, що початкова швидкість накопиченням ГАМК синаптосомами, що вимірюється протягом першої хвилини, майже однакова у таламусі та у корі, і трохи вище у гіпокампі (рис. 3.2).



	кора	гіпокамп	таламус
контроль	150,2	178,6	142,4
гіпоксія	140,8	167,7	143,5

Рис. 3.2. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії,

n = 10

* – $P \leq 0{,}05$ відносно контролю

На наступному етапі було з'ясовано, що перинатальна гіпоксія має різний вплив на динаміку роботи ГАМК-транспортерів у процесі постнатального розвитку в різних структурах головного мозку щурів. Так, зокрема, у корі статистично достовірних змін динаміки в роботі ГАМК-транспортерів не спостерігалось (рис. 3.3).

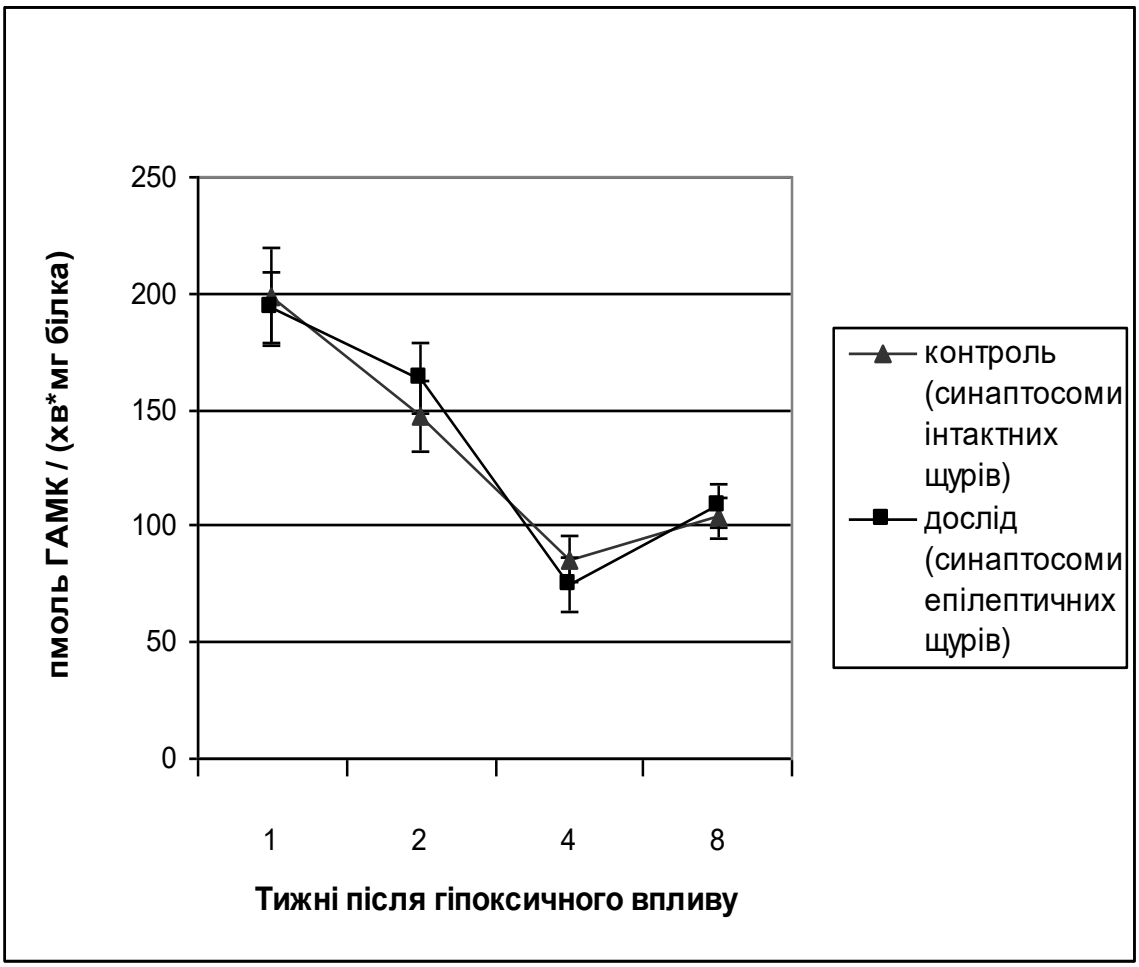


Рис. 3.3. Динаміка накопичення ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії, n = 10

* – $P \leq 0{,}05$ відносно контролю

Було виявлено, що гіпоксичний вплив знижує активність роботи транспортерів ГАМК у синаптосомах гіпокампу на 20,64±9,25 % та на 32,03±5,20 % відносно контролю, відповідно на другому та на восьмому тижнях після обробки щурят газовою сумішшю (рис. 3.4, рис. 3.5).

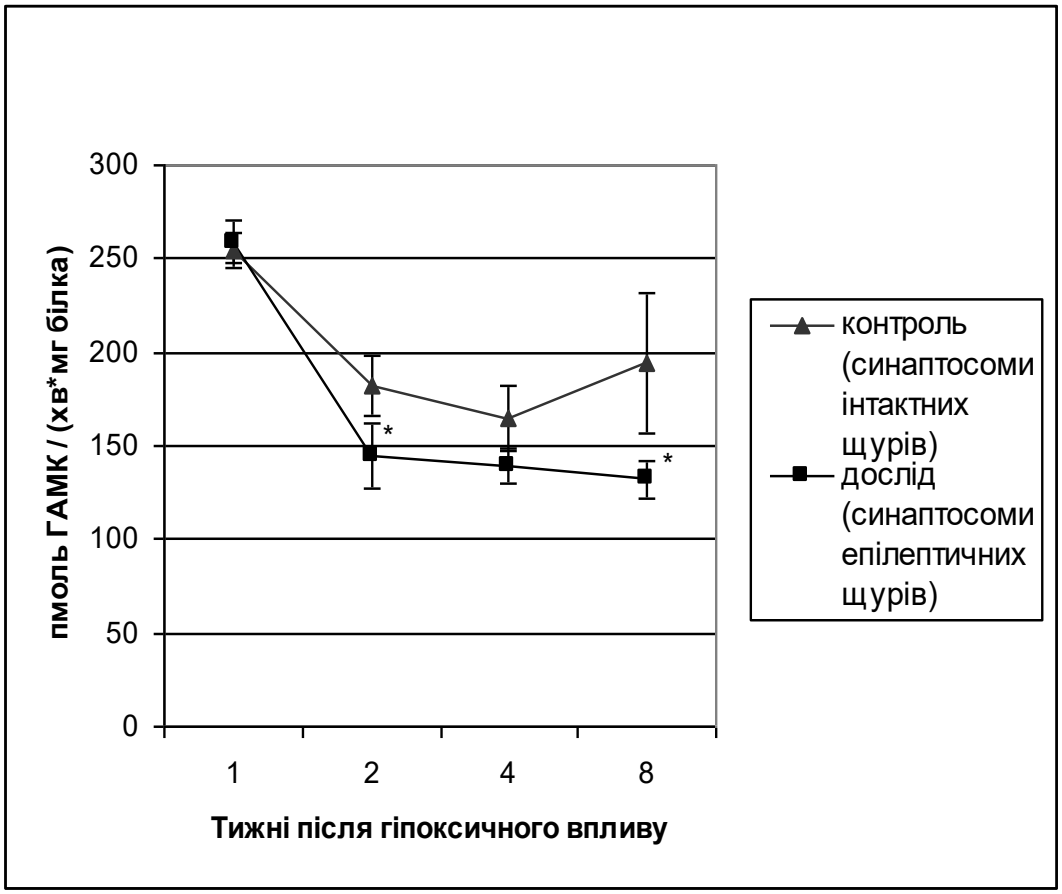


Рис. 3.4. Динаміка накопичення ГАМК синаптосомами гіпокампу головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії,

n = 10

* – $P \leq 0,05$ відносно контролю

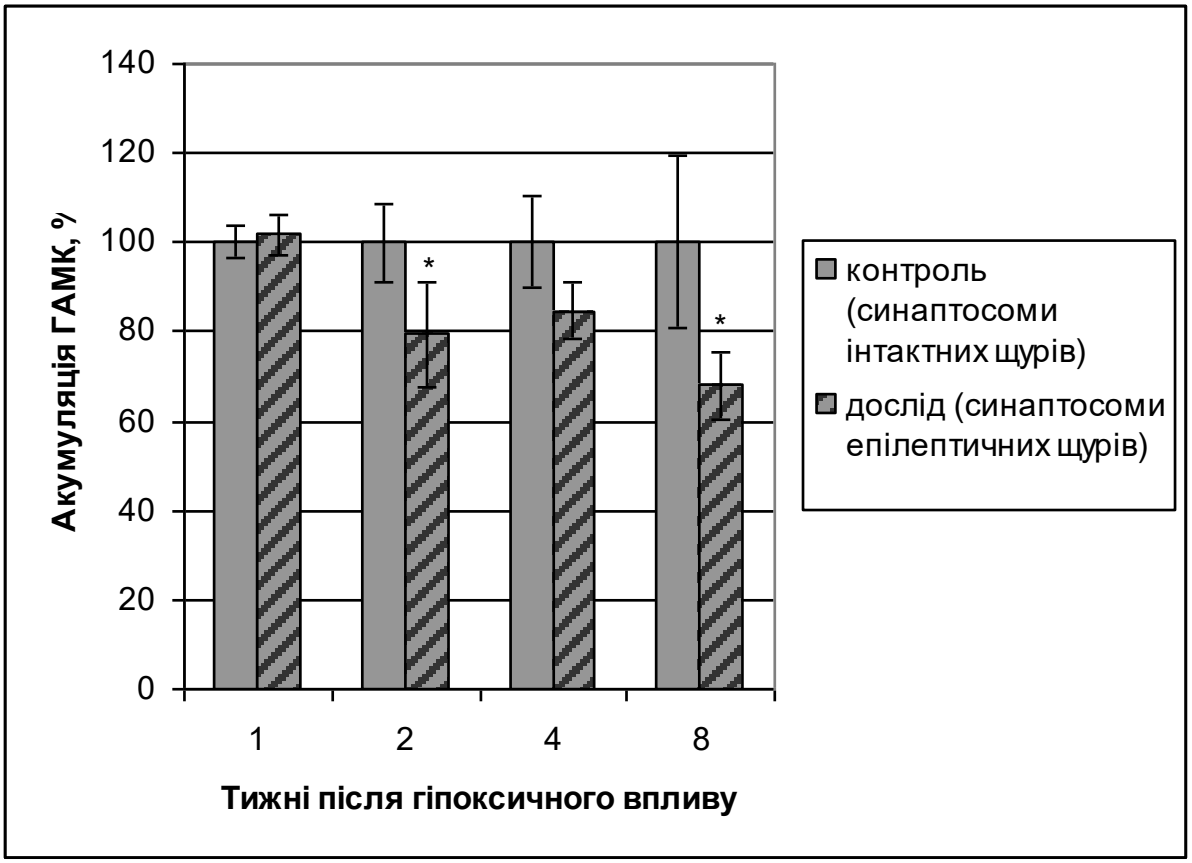


Рис. 3.5. Накопичення ГАМК синаптосомами гіпокампу головного мозку щурів за умов моделі перинатальні гіпоксії,

n = 10

* – $P \leq 0{,}05$ відносно контролю

У таламусі, навпаки, було показано підвищення накопичення ГАМК нервовими терміналями на 17,2±5,5 % та на 49,68±11,80 % відносно контролю, відповідно на першому та на восьмому тижнях після гіпоксичного впливу (рис. 3.6, рис. 3.7).

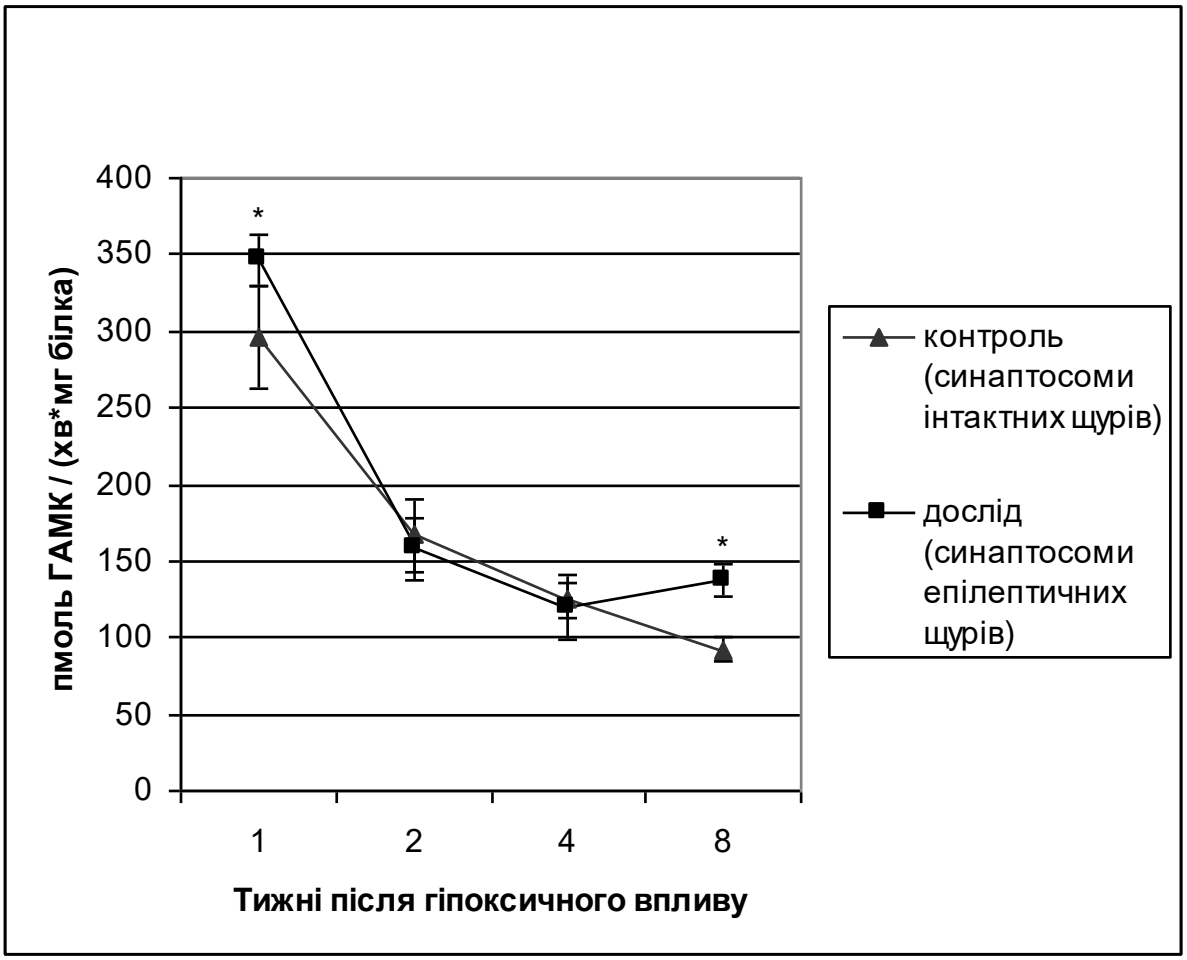


Рис. 3.6. Динаміка накопичення ГАМК синаптосомами таламусу головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії,

n = 10

* – $P \leq 0,05$ відносно контролю

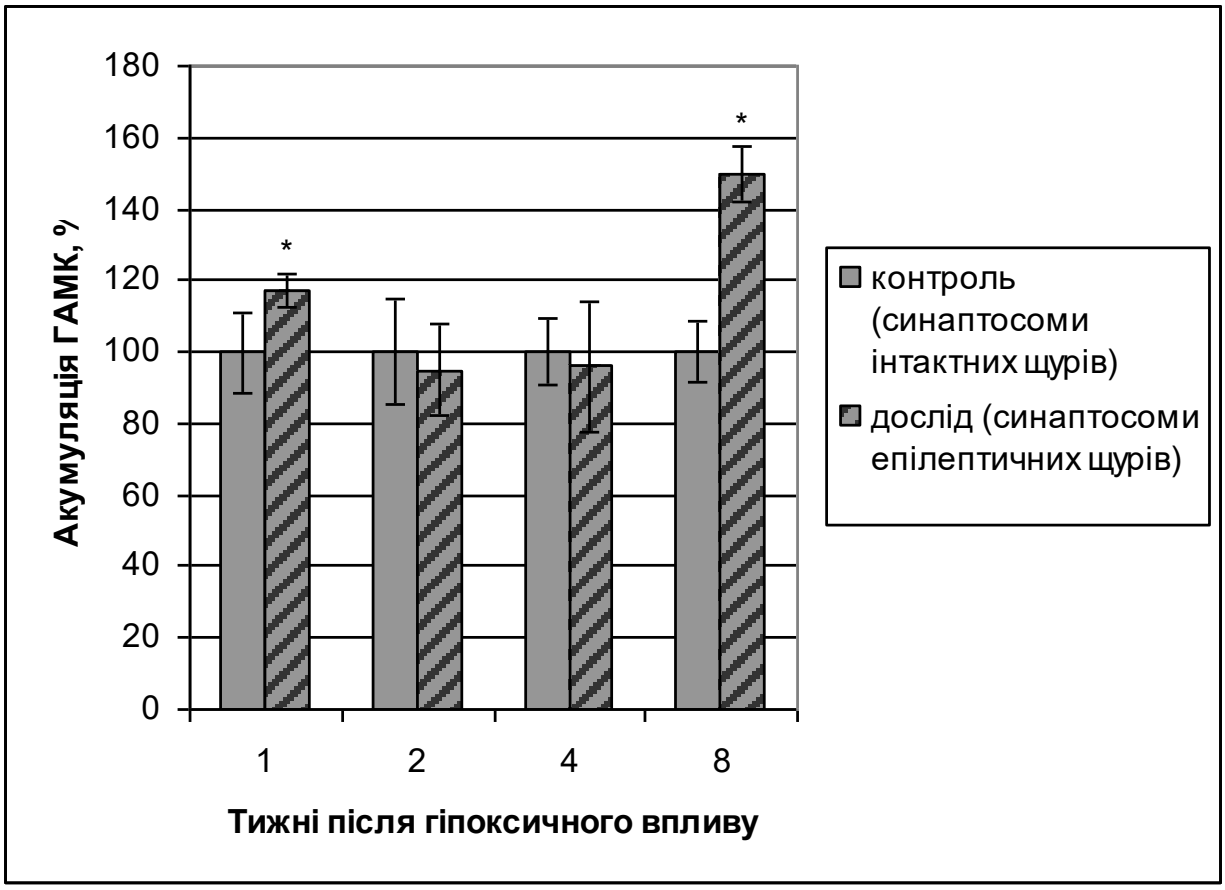


Рис. 3.7. Накопичення ГАМК синаптосомами таламусу головного мозку щурів за умов моделі перинатальної гіпоксії,

n = 10

* – $P \leq 0{,}05$ відносно контролю

Отже, було встановлено, що динаміка роботи ГАМК-транспортерів протягом 1-8 тижнів експерименту мала подібний характер у всіх структурах головного мозку як у нормі, так і за умов патології. Так, на другому тижні відбувалось різке пригнічення акумуляції ГАМК синаптосомами, протягом наступних двох тижнів воно суттєво сповільнювалося, а з четвертого до восьмого тижнів спостерігалося повільне зростання рівня акумуляції ГАМК, яке не досягало рівня першого тижня. Це свідчить про те, що саме на ранніх етапах розвитку головного мозку відбувається посилена активність і власне

розвиток ГАМК-ергічної системи, побудова нейрональних мереж і контактів, розвиток гальмівних синапсів.

Отже, рівень акумуляції (накопичення) синаптосомами головного мозку щурів ГАМК знижується з віком у обох групах тварин, але динаміка цих змін під впливом гіпоксичного стресу у різних областях мозку не є однаковою (табл. 3.1.). Так, у корі гіпоксичних тварин це зниження становить 15,7±7,9 %, 61,5±5,9 %, 43,9±4,7 % відповідно на другому, четвертому та восьмому тижнях після гіпоксичного стресу (за 100 % прийняте значення на першому тижні після гіпоксії), у корі контрольних тварин того ж віку зниження становить 25,9±7,6 %, 56,9±4,9 %, 47,7±4,5 % відповідно. У гіпокампі гіпоксичних щурів зниження акумуляції ГАМК синаптосомами було наступним: 44,1±6,5 %, 46,1±3,5 %, 48,9±3,9 % відповідно на другому, четвертому та восьмому тижнях після гіпоксії, а у контрольних того ж віку – на 28,4±6,3 %, 35,3±6,6 %, 23,5±6,6 % відповідно. Акумуляція ГАМК синаптосомами таламусу гіпоксичних щурів знизилася на на 54,3±5,9 %, 65,5±6,3 %, 60,3±3,1 % відповідно через два, чотири та вісім тижнів після гіпоксичного впливу, а у таламусі інтактних щурів того ж віку – на 43,6±8,3 %, 57,9±3,9 %, 68,9±2,6 % відповідно.

Таблиця 3.1.

Акумуляція ГАМК (у % відносно першого тижня) синаптосомами кори, гіпокампу і таламусу за умов моделі перинатальної гіпоксії (M±m, n=10)

Тижні після гіпоксії	Кора		Гіпокамп		Таламус	
	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія	Контроль	Гіпоксія
1-й	100±10,6	100±8	100±3,7	100±4,3	100±11,3	100±4,7
2-й	74,1±7,6*	84,3±7,9	71,6±6,3*	55,9±6,5*	56,3±8,3*	45,7±5,9*
4-й	43,1±4,9*	38,5±5,9*	64,7±6,6*	53,9±3,5*	42,1±3,9*	34,5±6,3*
8-й	52,3±4,5*	56,1±4,7*	76,5±6,6*	51,1±3,9*	31,1±2,6*	39,7±3,1*

* – $P \leq 0,05$ відносно першого тижня

Таким чином, нами було продемонстровано зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори і гіпокампу, виділеними з мозку щурів через 8-9 тижнів (період досягнення статевої зрілості) після того, як вони зазнали впливу гіпоксії і судом (у віці 10-12 днів після народження) у порівнянні з контрольними щурами, але ми не знайшли ніяких змін у таламусі (рис. 3.1).

Це пояснюється тим, що імовірно відбувається деяке підвищення експресії ГАМК-транспортерів у корі, як компенсаційний механізм у відповідь на гіпоксичний стрес, а гіпокампі – навпаки суттєве зниження цієї експресії, що, у свою чергу, сприятиме компенсаційному гальмуванню за рахунок підвищення позаклітинного рівня ГАМК у відповідь на інтенсифікацію процесів збудження. Щодо таламусу, то він не має високоафінної системи акумуляції ГАМК, і, за літературними даними [185-188], у ньому відсутні зміни експресії транспортерів внаслідок гіпоксії, тому

особливості акумуляції ГАМК синаптосомами таламусу потребують подальших досліджень.

Отримані дані чітко корелюють з нашими попередніми результатами досліджень щодо оцінки позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК в нервових закінченнях після перинатальної гіпоксії, під час яких було виявлено довготривале підвищення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК у корі та гіпокампі, в той же час у таламусі таких змін не спостерігалось [189, 190].

Як підсумок, можна сказати, що гіпоксія не впливає на структуру транспортерів, про що свідчить відсутність змін у їх спорідненості до ГАМК під дією гіпоксичного стресу. Однак вона впливає на щільність цих транспортерів у нервових терміналях, тобто на рівень їх експресії, оскільки початкова швидкість накопичення ГАМК знижується з віком у обох групах тварин. Але динаміка цих змін під впливом гіпоксії у різних областях мозку не є однаковою, і найбільш вразливою ділянкою до гіпоксичного пошкодження є гіпокамп.

Оскільки ГАМК онтогенетично є першим функціональним нейромедіатором в мозку, який розвивається, і виконує важливу функцію сигналізації для формування синапсів і синаптичної мережі, патологічні наслідки гіпоксії, перенесеної у ранньому віці, можуть бути результатом порушення регуляції процесу дозрівання мозку [191].

Підсумовуючи усі вище наведені факти та власне результати наших досліджень, можна сказати, що глобальна гіпоксія суттєво впливає на процес реакумуляції позаклітинної ГАМК пресинаптичними терміналями, але вектори і механізми змін є різними в різних структурах головного мозку. Якщо початкова швидкість акумуляції ГАМК в корі не зазнала впливу гіпоксії, а у таламусі спостерігалось навіть деяке її підвищення, то у гіпокампі процес акумуляції ГАМК значно уповільнюється. Це дає підставу вважати, що наслідком гіпоксії є порушення балансу гальмівних процесів між гіпокампом і корою.

3.2. Вплив NO-711 та β-аланіну на високоафінне транспортер-опосередковане накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів

3.2.1. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями кори головного мозку щурів

У першій серії експериментів з NO-711, високоселективним блокатором транспортерів ГАМК типу GAT1, та β-аланіном, субстратним інгібітором транспортерів ГАМК типу GAT3, ми оцінили, як час інкубації синаптосом з інгібіторами впливає на накопичення [^{3}H]ГАМК.

Було проведено порівняльний аналіз «гострих» ефектів інгібіторів ГАМК транспортерів на швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК та їх ефектів після попередньої інкубації з синаптосомами протягом 15 хвилин. Під час дослідження «гострих» ефектів інгібітори додавали в середовище інкубації одночасно з [^{3}H]ГАМК, яка ініціює початок процесу накопичення нейромедіатора. За початкову швидкість вважається накопичення нейромедіаторів синаптосомами за першу хвилину.

На синаптосомах кори головного мозку було показано, що «гострий» ефект високоселективного блокатора транспортерів ГАМК GAT1 типу NO-711 (30 мкМ) був таким же, як і ефект після його попередньої інкубації з синаптосомами протягом 15 хвилин. NO-711 знижував накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за 5 хвилин на 94,3% у випадку одночасного додавання з [^{3}H]ГАМК та на 93,6% після попередньої інкубації (рис. 3.8, А)

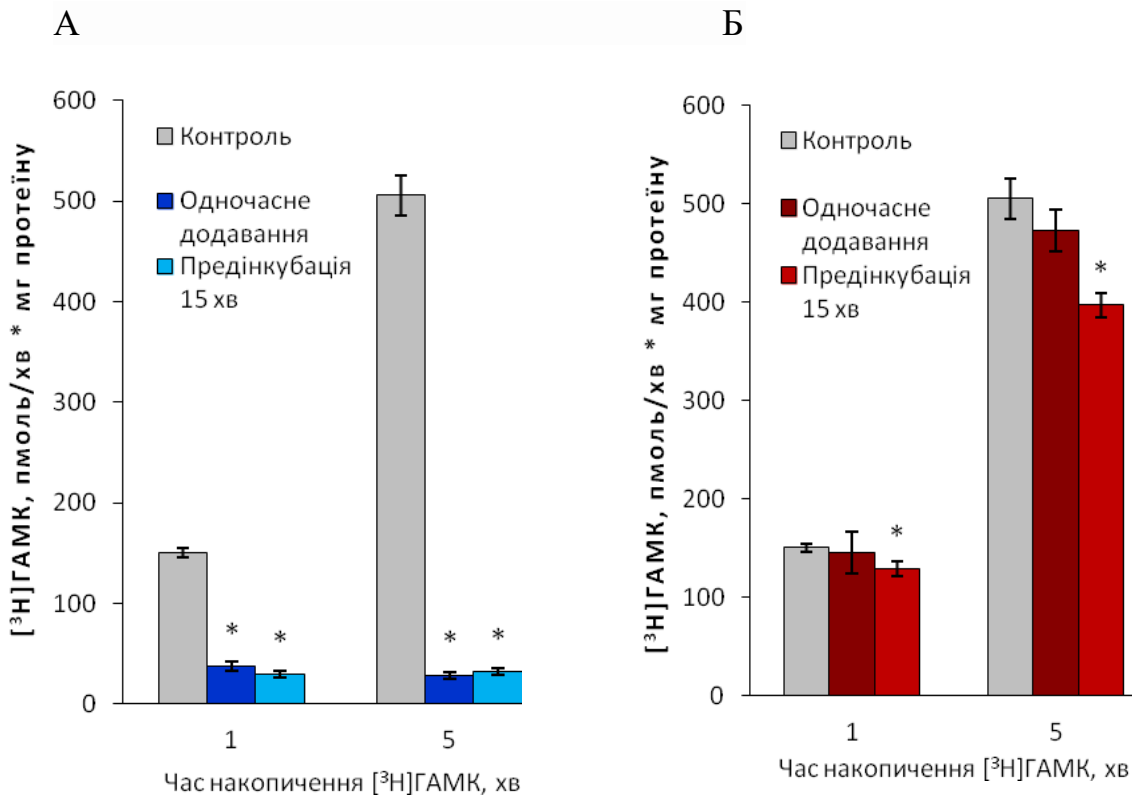


Рис. 3.8. Накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів за дії 30 мкМ NO-711 (А) та 100 мкМ β-аланіну (Б);

n=6

* P≤0,05 відносно контролю

На рис.3.8, Б представлено накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами під впливом субстратного інгібітора транспортерів ГАМК GAT3 типу β-аланіну (100 мкМ). За умов додавання β-аланіну одночасно з [^{3}H]ГАМК до середовища інкубації спостерігали незначне зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами та її акумуляції за 5 хвилин – на 3% та 6,3% відповідно. Однак, після попередньої інкубації синаптосом з β-аланіном протягом 15 хвилин спостерігалось зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК на 14,1%, а накопичення [^{3}H]ГАМК за 5 хвилин на 21,4%. Отже, після попередньої інкубації інгібіторний ефект β-аланіну посилювався. Аналогічна залежність інгібіторного ефекту NO-711 та β-

аланіну від часу інкубації спостерігалась і в експериментах на синаптосомах таламусу та гіпокампу.

В наступних експериментах був проаналізований вплив NO-711 і β-аланіну на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів через 8-9 тижнів після перинатальної гіпоксії та контрольних того ж віку. Протокол експериментів з інгібіторами включав попередню інкубацію синаптосом з 30мкМ NO-711 або зі 100 мкМ β-аланіном протягом 15 хвилин.

Дослідження накопичення [^{3}H]ГАМК нервовими терміналями кори головного мозку щурів контрольної групи виявили, що початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК під впливом NO-711 знижувалась на 80,1% – з 150,2±2,4 пмоль/хв × мг протеїну до 29,3±3,9 пмоль/хв × мг протеїну (рис. 3.2.1.2). Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори щурів, які зазнали перинатальної гіпоксії, становила 140,8±1,9 пмоль/хв × мг протеїну. За присутності NO-711 початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК знижувалась на 78,2% і складала 30,7±2,1 пмоль/хв × мг протеїну. Таким чином, вплив NO-711 на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори контрольних тварин і тих, які зазнали впливу гіпоксії, виявився подібним.

Під впливом β-аланіну (рис. 3.9) початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку контрольних щурів знижувалась на 14,1% і становила 129,1±3,8 пмоль/хв × мг протеїну. У щурів, які зазнали умов гіпоксії, початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори за присутності β-аланіну знижувалась на 15,1% і складала 120,0±3,1 пмоль/хв × мг протеїну. Таким чином, ефективність дії β-аланіну суттєво не змінювалась у тварин, що зазнали перинатальної гіпоксії.

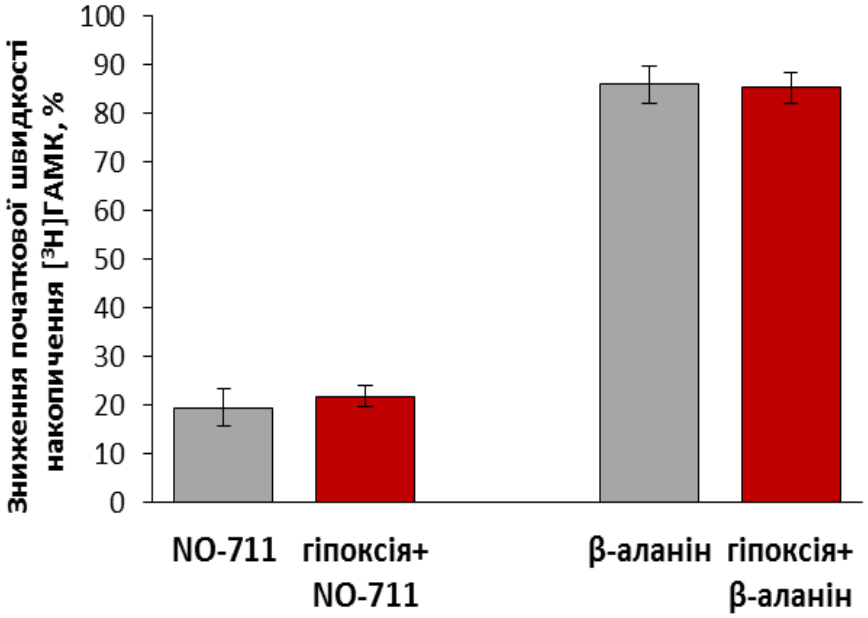


Рис. 3.9. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів під впливом 30 мкМ NO-711 та 100 мкМ β-аланіну. За 100% прийнято початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК без додавання інгібіторів.

3.2.2. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями гіпокампу щурів

У синаптосомах гіпокампу (рис. 3.10) NO-711 знижував початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК на 84,3% – з 178,6±2,8 пмоль/хв × мг протеїну в контролі до 28,0±1,1 пмоль/хв × мг протеїну у присутності 30 мкМ NO-711. У гіпокампі щурів, які зазнали умов гіпоксії у ранньому віці, початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами становила 167,7±2,1 пмоль/хв × мг протеїну. Інкубація синаптосом з 30 мкМ NO-711 призводила до зниження швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК на 80,1% – до 32,6±1,2 пмоль/хв × мг протеїну. Таким чином, ефективність впливу NO-711 на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу

знижувалась у тварин, що зазнали перинатальної гіпоксії у порівнянні з контрольними.

За присутності у середовищі інкубації 100 мкМ β-аланіну (рис. 3.2.2) початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу контрольних щурів знижувалась на 14,4% і становила 152,9±4,3 пмоль/хв × мг протеїну. У щурів, які зазнали впливу гіпоксії, початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу за присутності β-аланіну знижувалась на 22,1% і становила 130,7±3,2 пмоль/хв × мг протеїну. Отже, ефект β-аланіну посилювався у нервових закінченнях гіпокампу тих тварин, які зазнали умов перинатальної гіпоксії.

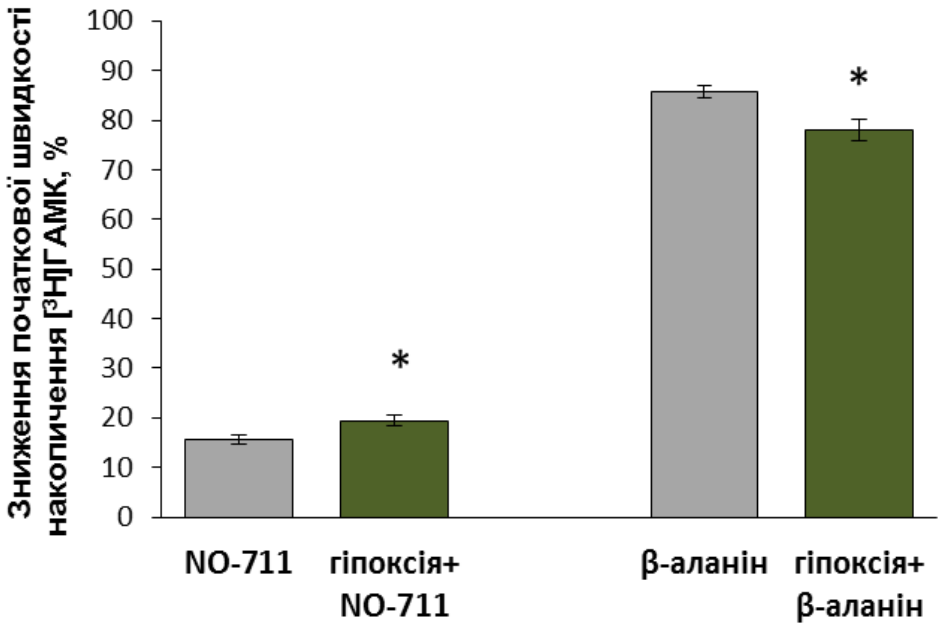


Рис. 3.10. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу щурів під впливом 30 мкМ NO-711 та 100 мкМ β-аланіну. За 100% прийнята початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК без додавання інгібіторів;

n=7

* P≤0,05 відносно контролю

3.2.3. Ефект NO-711 та β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК ізольованими нервовими закінченнями таламусу щурів

У нервових терміналях таламусу (рис. 3.11) контрольних щурів NO-711 знижував початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК на 79,6% – з 142,4±4,8 пмоль/хв × мг протеїну до 29,0±2,1 пмоль/хв × мг протеїну. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами таламусу щурів, які зазнали впливу гіпоксії, за дії 30 мкМ NO-711 знижувалась на 70,9% – з 143,5±4,2 пмоль/хв × мг протеїну до 41,8±3,4 пмоль/хв × мг протеїну. Таким чином, ефективність впливу NO-711 зменшувалась у нервових закінченнях таламусу тварин, які зазнали умов перинатальної гіпоксії, порівняно з контрольними.

За умов 15-хвилинної попередньої інкубації синаптосом таламусу контрольних щурів зі 100 мкМ β-аланіну (рис. 3.11) початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК знижувалась на 20,2% і становила 113,6±3,3 пмоль/хв × мг протеїну. У щурів, які зазнали умов перинатальної гіпоксії, β-аланін викликав зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами таламусу на 30,2%, що складала 100,1±2,5 пмоль/хв × мг протеїну. Отже, вплив β-аланіну посилився у нервових закінченнях таламусу щурів, які зазнали умов гіпоксії у ранньому віці.

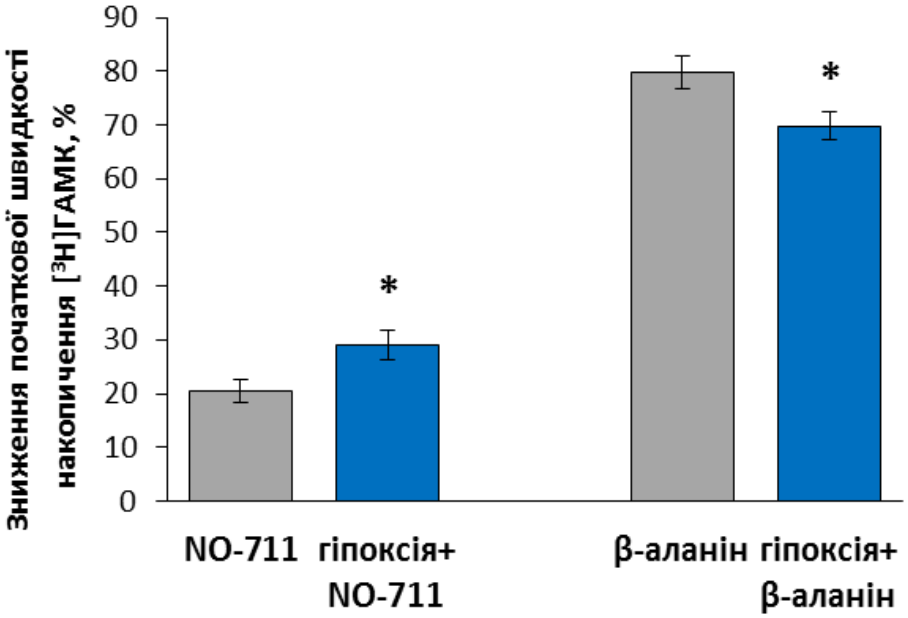


Рис. 3.11. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами таламусу щурів під впливом 30 мкМ NO-711 та 100 мкМ β-аланіну. За 100% прийнята початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК без додавання інгібіторів;

n=6

* P≤0,05 відносно контролю

ГАМК відіграє ключову роль у регуляції збудливості нейронів і підтримці балансу між процесами гальмування та збудження. Сполуки, що взаємодіють з транспортерами ГАМК GAT1 та GAT3 типів, становлять особливий науковий інтерес з точки зору підвищення ГАМК-нейротрансмісії, особливо це стосується високоселективних інгібіторів GAT3, і на сьогодні про них дуже мало відомо [7]. До теперішнього часу для лікування парціальних епілептичних нападів використовували тільки тіагабін – селективний інгібітор транспортеру GAT1 [192].

Враховуючи те, що основними типами ГАМК-транспортерів, які визначають оптимальний рівень позаклітинної ГАМК у головному мозку, є GAT1 і GAT3, нами було проаналізовано вплив високоселективного

блокатора GAT1 – NO-711 та субстратного інгібітора GAT3 – β-аланіну на накопичення [^{3}H]ГАМК нервовими закінченнями головного мозку щурів. Було показано, що у синаптосомах кори ефективність дії NO-711 та β-аланіну не змінювались після перинатальної гіпоксії у порівнянні з контролем. У нервових закінченнях гіпокампу і таламусу ефективність дії β-аланіну підвищувалась внаслідок впливу перинатальної гіпоксії, тоді як ефективність NO-711 зменшувалася. Наші дані про вплив NO-711 і β-аланіну в таламусі дають підставу вважати, що співвідношення експесованих на мембрані транспортерів GAT1 і GAT3 типу змінилося після впливу перинатальної гіпоксії, забезпечуючи таким чином компенсаторний механізм, що лежить в основі підтримки оптимального рівня позаклітинної ГАМК. В той же час відсутність змін в ефективності дії NO-711 та β-аланіну в корі головного мозку може відображати стабільність співвідношення GAT1/GAT3 після перинатальної гіпоксії. Нещодавно ми також показали, що перинатальна гіпоксія не спричиняє змін у спорідненості до субстрату ГАМК-транспортерів у корі, гіпокампі і таламусі [189], і це також дозволяє припустити, що зміна ефективності дії інгібіторів після перинатальної гіпоксії більшою мірою пов'язана зі змінами кількості транспортерів у плазматичній мембрані, ніж зі спорідненістю інгібіторів до субстратзв'язуючих сайтів транспортерів ГАМК.

Наші припущення про те, що внаслідок впливу гіпоксії змінюється експресія різних типів транспортерів ГАМК, підтверджують і літературні дані. Так, зокрема, Melone та співавт. [193] показали, що тимчасова фокальна ішемія у щурів викликає нову нейрональну експресію транспортерів GAT3 типу у корі поблизу місць ушкодження. Dalby та співавт. [194] зазначили, що при епілепсії для ефективності дії неселективних інгібіторів накопичення ГАМК вкрай важливим є саме співвідношення GAT1/GAT3. Показано, що активація GAT1 протеїнкіназою С, індукована серин/треоніновим фосфорилюванням, в свою чергу, сприяє інтерналізації GAT1, а за

присутності активаторів тирозинкінази прискорюється вбудовування GAT1 у плазматичну мембрану [195]. Варто також зазначити, що GAT3-опосередковане поглинання ГАМК відіграє роль тільки за певних фізіологічних чи патологічних умов, і це призводить до підвищення активності нейронів та нормалізує рівень вивільнення ГАМК у стріатумі [196].

Експерименти із застосуванням екзогенного β-аланіну є особливо цікавими, оскільки ця молекула легко всмоктується з шлунково-кишкового тракту і транспортується до ЦНС. β-аланін потрапляє до ЦНС через гематоенцефалічний бар'єр за допомогою таурин-чутливого транспортеру β-амінокислот Na^+,Cl^- - залежним чином. Цей транспортер високоселективний для β-амінокислот, тому що ні L-глутамат (який транспортується аніонним транспортером амінокислот), ні L-фенілаланін (який транспортується нейтральним транспортером амінокислот) не впливають на рух β-аланіну через гематоенцефалічний бар'єр. β-аланін також може долати гематоенцефалічний бар'єр шляхом пасивної дифузії [197]. Аналоги β-аланіну пропонуються для лікування епілепсії і в якості основи для створення протиепілептичних препаратів [198]. При пероральному введенні концентрація β-аланіну в плазмі крові зростає швидко, досягаючи максимуму через 30-45 хв, і значно знижується протягом 90-120 хв [199]. Незважаючи на те, що β-аланін є простою амінокислотою, він залишається малодослідженим і як неврологічний препарат, і як основа для створення нових терапевтичних препаратів [200].

Наші дані щодо впливу β-аланіну можуть бути цікавими ще й тому, що β-аланін має велике фізіологічне значення. β-аланін широко розповсюджений у мозку і є однією з небагатьох природних β-амінокислот ендогенного походження у людини та ссавців. Середня концентрація β-аланіну в головному мозку варіює між 0,03 та 0,08 мМ. Цей діапазон є аналогічним концентрації ГАМК у ЦНС [3]. Детальне вивчення концентрацій β-аланіну в

головному мозку щурів показало регіональні відмінності: середній мозок містить найвищу концентрацію (0,108 ммоль/г замороженої маси); кора містить трохи більше половини цього значення (0,065 ммоль/г), в той час як мозочок містить найнижчу концентрацію (0,039 ммоль/г). Відмінність концентрацій в різних структурах ЦНС характерна і для ГАМК. В ЦНС β-аланін послаблює нейрональну активність з такою ж ефективністю, як і ГАМК [197]. Однак, роль β-аланіну у розвитку неврологічних розладів потребує більшого з'ясування. У цьому контексті, наші дані можуть бути цінними для аналізу ймовірного міжсинаптичного перехресного впливу між ГАМК- та β-аланін-ергічними нервовими терміналями. Тобто, вивільнений з нервових терміналей β-аланін може інгібувати поглинання ГАМК транспортерами GAT3 типу. Крім того, Mathers та ін. [201] нещодавно показали, що хімічна передача у гальмівних синапсах таламусу включає в себе активацію рецепторів β-аланіном. Важливість β-аланіну для синаптичної передачі підтримується тим фактом, що у пацієнтів з β-аланінемією (накопичення β-аланіну як вроджене порушення метаболізму) можуть розвиватися нейрологічні відхилення, механізми яких досі не зрозумілі [202].

Необхідно підкреслити, що крім ГАМК-транспортерів, β-аланін має п'ять визнаних сайтів зв'язування з рецепторами: сайт ко-агоніста гліцину на NMDA рецепторі; сайт на гліциновому рецепторі; сайти на $ГАМК_A$- і $ГАМК_C$-рецепторах [197]. Пресинаптичні глутаматні рецептори NMDA типу локалізовані на нервових терміналях гіпокампу та кори головного мозку. Активація глутаматних рецепторів може впливати на ефективність як збуджуючої, так і гальмівної нейропередачі. Оскільки дисбаланс між збудженням і гальмуванням вважається вирішальним фактором в етіології нейрологічних розладів, що виникають після гіпоксії та судом у ранньому віці, β-аланін може мати широкий спектр застосування, в тому числі в якості додаткового регулювання ГАМК- та глутамат-ергічної нейротрансмісії.

3.3. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на ключові характеристики ГАМКергічної нейропередачі у різних відділах головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії

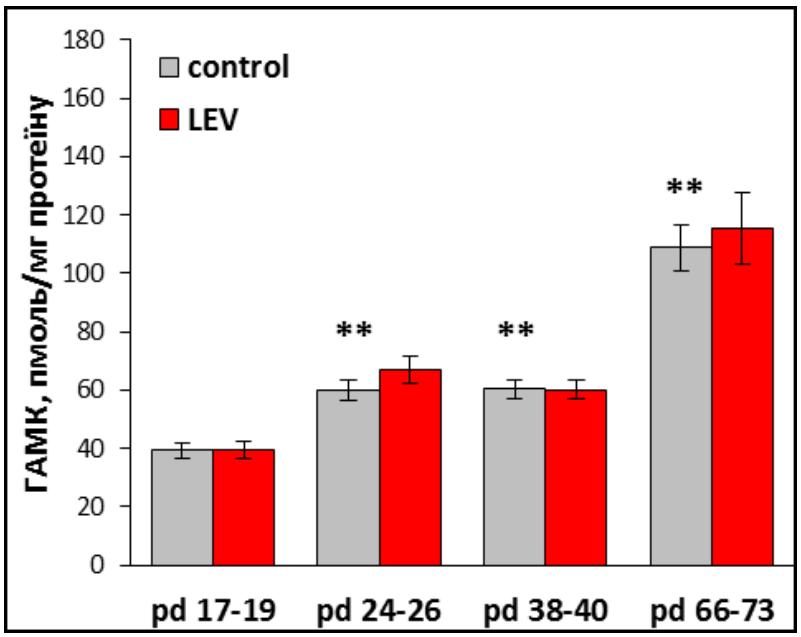
3.3.1. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у корі головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії

У синапотосомах кори головного мозку щурів антиепілептичний препарат Леветирацетам (100 мкМ) не впливав на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК, який складав: 39.33±2.89 пмоль/мг протеїну у віці 17-19 постнатальний день, 67.01±4.83 пмоль/мг протеїну у віці 24-26 постнатальний день, 60.16±3.42 пмоль/мг протеїну у віці 38-40 постнатальний день, 115.26±12.41 пмоль/мг протеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.12, А).

Антиепілептичний препарат Леветирацетам також не змінював позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах кори головного мозку щурів і за умов моделі перинатальної гіпоксії, який становив: 36.58±2.17 пмоль/мг мротеїну у віці 17-19 постнатальний день, 64.45±7.12 пмоль/мг мротеїну у віці 24-26 постнатальний день, 76.24±5.11 пмоль/мг мротеїну у віці 38-40 постнатальний день, 155.12±11.54 пмоль/мг мротеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.12, Б).

Таким чином, позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах кори головного мозку щурів збільшується протягом постнатального розвитку на 24-26 та 66-73 постнатальні дні, але найбільше він зростає за умов моделі перинатальної гіпоксії у віці 66-73 постнатальний день ($p < 0.01$, відносно норми на 66-73 постнатальний день, n=9). Антиепілептичний препарат Леветирацетам не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах кори головного мозку щурів як у нормі, та і за умов моделі перинатальної гіпоксії у всіх вікових групах досліджуваних тварин.

А



Б

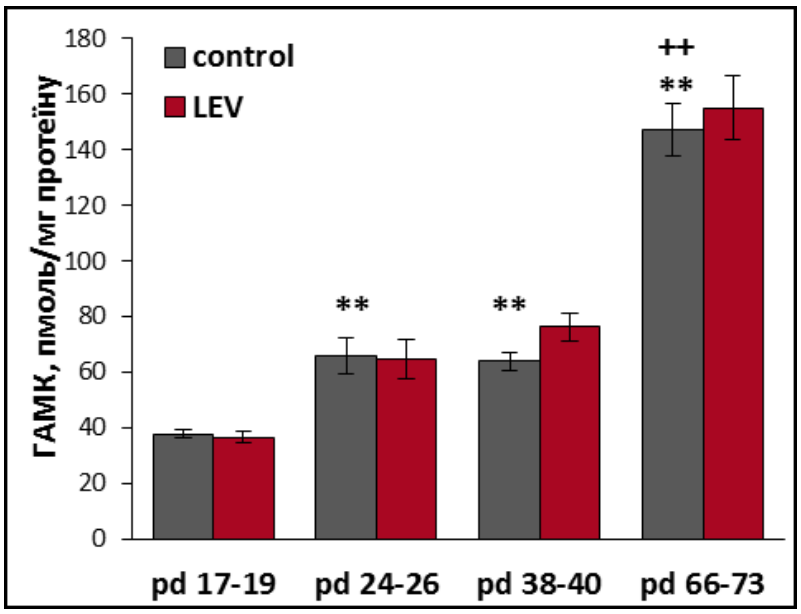


Рис. 3.12. Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах кори головного мозку щурів різного постнатального віку (день 17-19, день 24-26, день 38-40 and день 66-73) за відсутності (виділено сірим) та за присутності у середовищі інкубації Леветирацетаму (100 μM) (виділено червоним) у нормі (**А**) та за умов моделі перинатальної гіпоксії (**Б**).

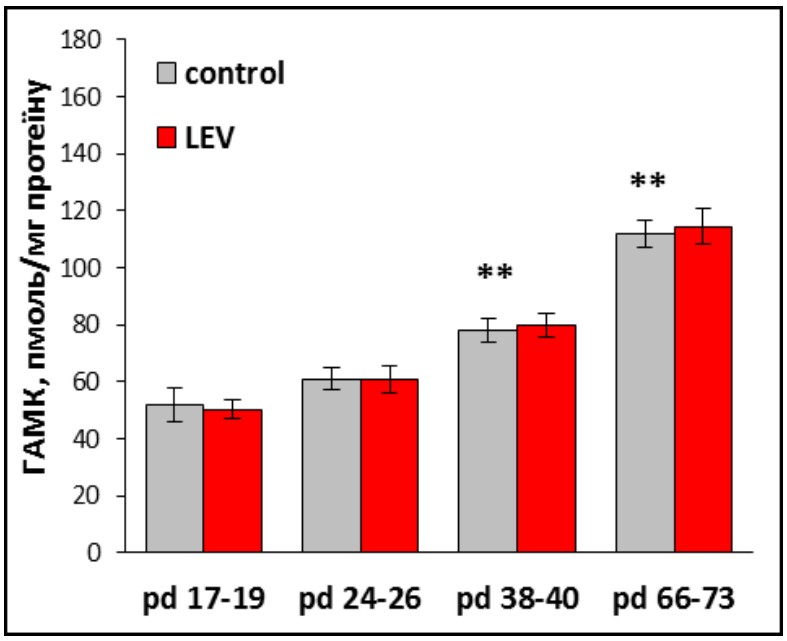
**, p <0.01 відносно контролю на 17-19 постнатальний день. +, p <0.05; ++, p <0.01 відносно показників у нормі того ж віку.

3.3.2. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у гіпокампі щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії

У гіпокампі щурів було показано, що антиепілептичний препарат Леветирацетам (100 мкМ) не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК. Це показник (після 15 хв інкубації з препаратом) складає 50.44±3. пмоль/мг протеїну у віці 17-19 постнатальний день, 60.86±4.49 пмоль/мг мротеїну у віці 24-26 постнатальний день, 79.99±4.30 пмоль/мг мротеїну у віці 38-40 постнатальний день, 114.51±6.28 пмоль/мг мротеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.13, А).

Антиепілептичний препарат Леветирацетам також не змінював позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах гіпокампу щурів і за умов моделі перинатальної гіпоксії, який становив: 95.99±8.60 пмоль/мг протеїну у віці 17-19 постнатальний день, 95.15±10.70 пмоль/мг протеїну у віці 24-26 постнатальний день, 107.25±13.19 пмоль/мг протеїну у віці 38-40 постнатальний день, 135.92±5.91 пмоль/мг протеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.13, Б).

А



Б

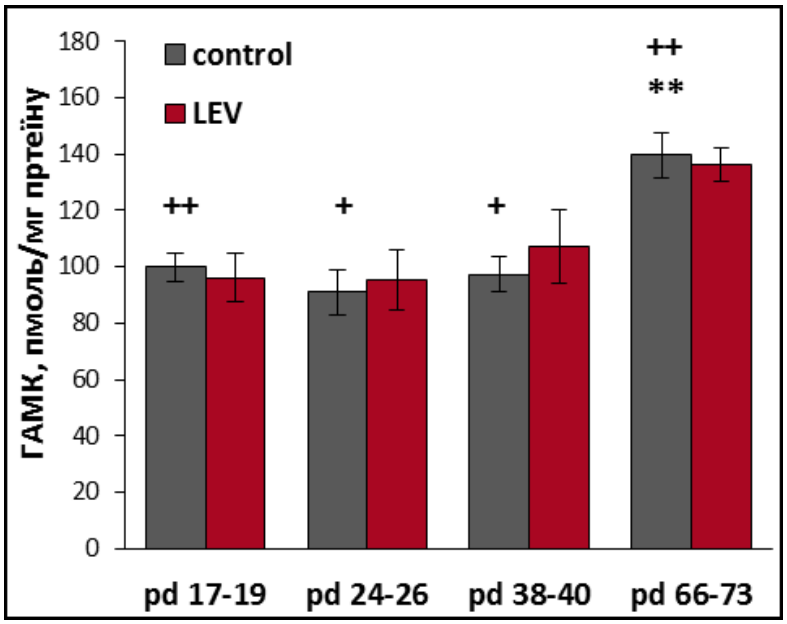


Рис. 3.13. Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах гіпокампу щурів різного постнатального віку (день 17-19, день 24-26, день 38-40 та день 66-73) за відсутності (виділено сірим) та за присутності у середовищі інкубації Леветирацетаму (100 μM) (виділено червоним) у нормі (**А**) та за умов моделі перинатальної гіпоксії (**Б**).

**, $p < 0.01$ відносно контролю на 17-19 постнатальний день. +, $p < 0.05$; ++, $p < 0.01$ відносно показників у нормі того ж віку.

Таким чином, позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах гіпокампу щурів збільшується протягом постнатального розвитку на 38-40 та 66-73 постнатальні дні, але найбільше він зростає за умов моделі перинатальної гіпоксії у всіх вікових групах досліджуваних тварин. Антиепілептичний препарат Леветирацетам не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах гіпокампу мозку щурів як у нормі, та і за умов моделі перинатальної гіпоксії у всіх вікових групах досліджуваних тварин.

3.3.3. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на позаклітинний рівень ГАМК у таламусі щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії

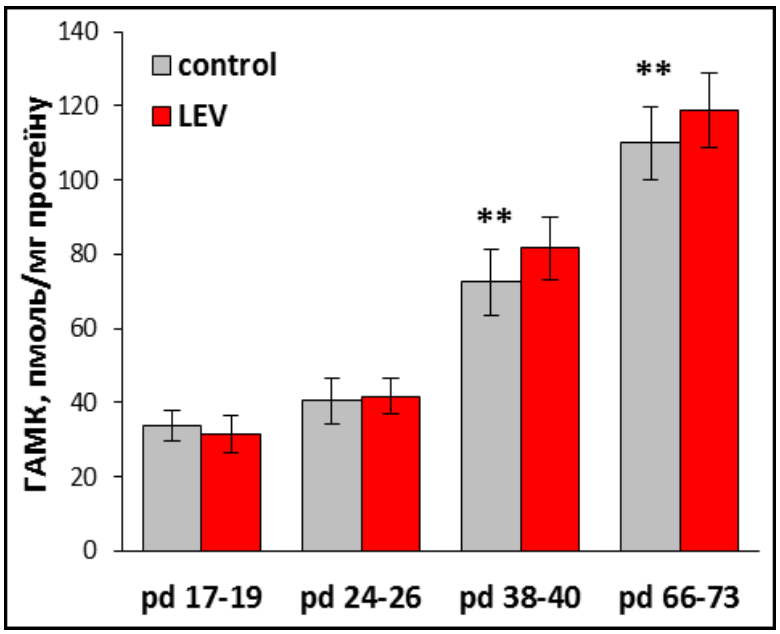
У таламусі щурів було показано, що антиепілептичний препарат Леветирацетам (100 мкМ) не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК. Це показник (після 15 хв інкубації з препаратом) складає 31.53±5.20 пмоль/мг протеїну у віці 17-19 постнатальний день, 41.62±4.80 пмоль/мг протеїну у віці 24-26 постнатальний день, 81.80±8.46 пмоль/мг протеїну у віці 38-40 постнатальний день, 119.00±15.10 пмоль/мг протеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.14, А).

Антиепілептичний препарат Леветирацетам також не змінював позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синапотосомах гіпокампу щурів і за умов моделі перинатальної гіпоксії, який становив: 42.36±3.58 пмоль/мг протеїну у віці 17-19 постнатальний день, 45.84±3.67 пмоль/мг протеїну у віці 24-26 постнатальний день, 68.12±8.50 пмоль/мг протеїну у віці 38-40 постнатальний день, 112.16±8.94 пмоль/мг протеїну у віці 66-73 постнатальний день (рис.3.14, Б).

Таким чином, рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах таламічних нервових закінчень збільшувався під час розвитку у віці 38-40 постнатальний день та

66-73 постнатальний день, а перинатальна гіпоксія не збільшувала цього значення. Антиепілептичний препарат Леветирацетам не впливав на рівень [^{3}H]ГАМК у суспензіях таламічних синаптосом у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії у всіх досліджуваних вікових групах.

А



Б

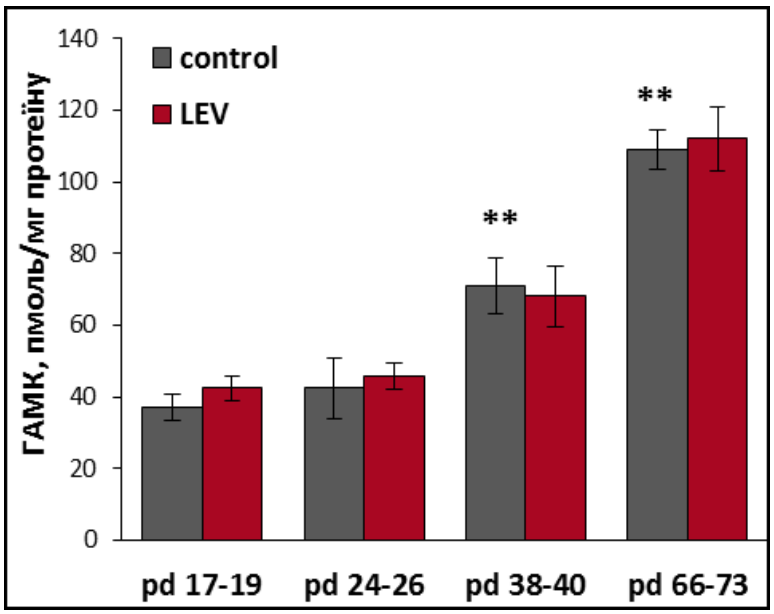


Рис. 3.14. Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах таламусу щурів різного постнатального віку (день 17-19, день 24-26, день 38-40 та день 66-73) за відсутності (виділено сірим) та за присутності у середовищі інкубації Леветирацетаму (100 μM) (виділено червоним) у нормі (**А**) та за умов моделі перинатальної гіпоксії (**Б**).

**, p <0.01 відносно контролю на 17-19 постнатальний день.

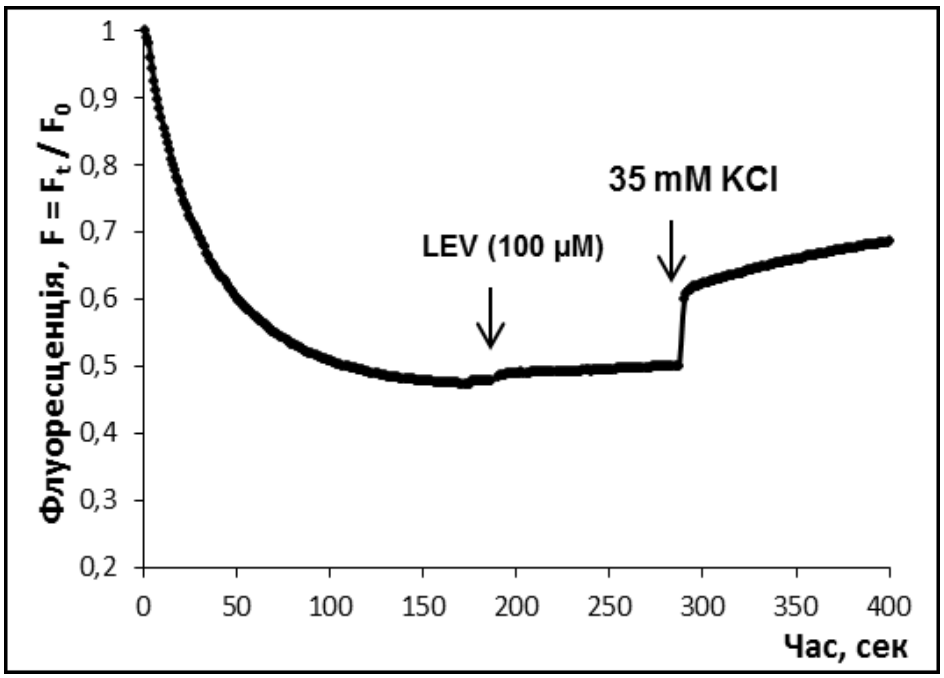
3.3.4. Вплив антиепілептичного препарату Леветирацетаму на екзоцитоз [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу, таламусу і кори головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії

Ключовим параметром, який суттєво впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК та вивільнення шляхом екзоцитозу з нервових закінчень, є потенціал плазматичної мембрани нервових закінчень. Потенціал плазматичної мембрани вимірювали за допомогою родаміну 6G, катіонного потенціометричного барвника, який зв'язується з негативними зарядами мембран. Препарат Леветирацетам у концентрації 100 мкМ сам по собі не викликає змін у спектрі випромінювання родаміну. Додавання Леветирацетаму (100 мкМ) також не вплинуло на сигнал флуоресценції родаміну 6G у синаптосомах гіпокампу (рис. 3.15, А), що відображає відсутність деполяризації плазматичної мембрани. Попередня інкубація синаптосом гіпокампу з препаратом у тій же концентрації протягом 15 хв не змінила мембранного потенціалу. Отже, Леветирацетам під час гострого введення та після попередньої інкубації був інертним щодо мембранного потенціалу синаптосом, виділених з усіх досліджуваних ділянок мозку. Ці дані узгоджуються з результатами попереднього підрозділу про відсутність впливу препарату на позаклвтинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах синаптосом.

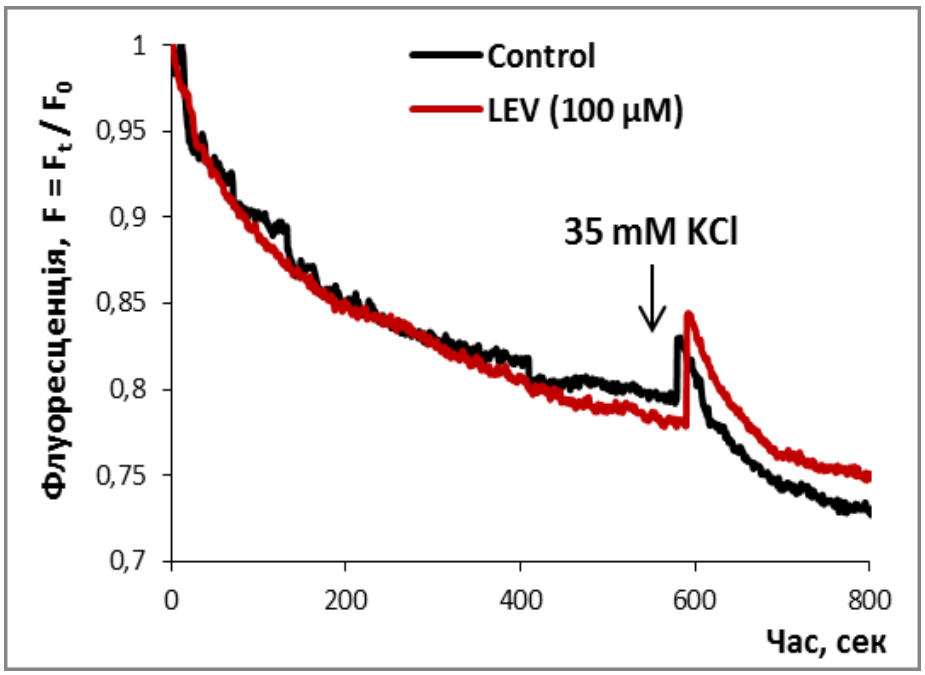
Синаптичні везикули всередині нервових закінчень накопичують нейромедіатори за допомогою специфічних везикулярних транспортерів, які керуються протонним електрохімічним градієнтом. Акридиновий оранжевий, pH-чутливий флуоресцентний барвник, був використаний для вимірювання екзоцитозу синаптичних везикул [203-205]. Сам Леветирацетам не впливає на флуоресценцію акридинового оранжевого, оскільки не було виявлено суттєвих змін у спектрі випромінювання акридинового оранжевого у відповідь на додавання 100 мкМ препарату. На рис. 3.15, Б показано

відсутність гострого впливу Леветирацетаму (100 мкМ) на протонний градієнт синаптичних везикул, оскільки препарат не збільшував інтенсивність флуоресценції акридинового оранжевого, що свідчило про відсутність змін ацидифікації синаптичних везикул. За умов попереднтьої інкубації синаптосом з препаратом (100 мкМ) у середовищі, що містить Ca^{2+}, протягом 15 хвилин сплеск флуоресценції, індукований деполяризацією мембрани з використанням 35 мМ KCl, був вищим, ніж у контролі, що відображало збільшення екзоцитозу (рис. 3.15, В). Контрольні синаптосоми попередньо інкубували за тих самих умов зі стандартним сольовим розчином. Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) [$F(1,16)=10,45$; $p< 0,01$; $n=9$].

А



Б



В

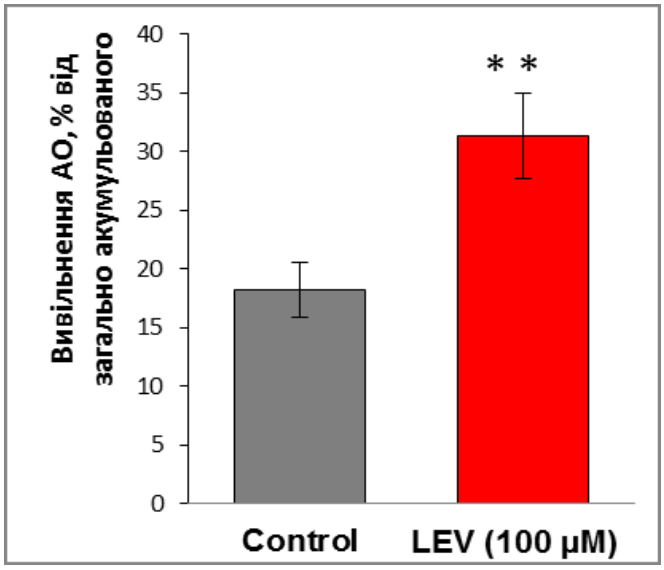
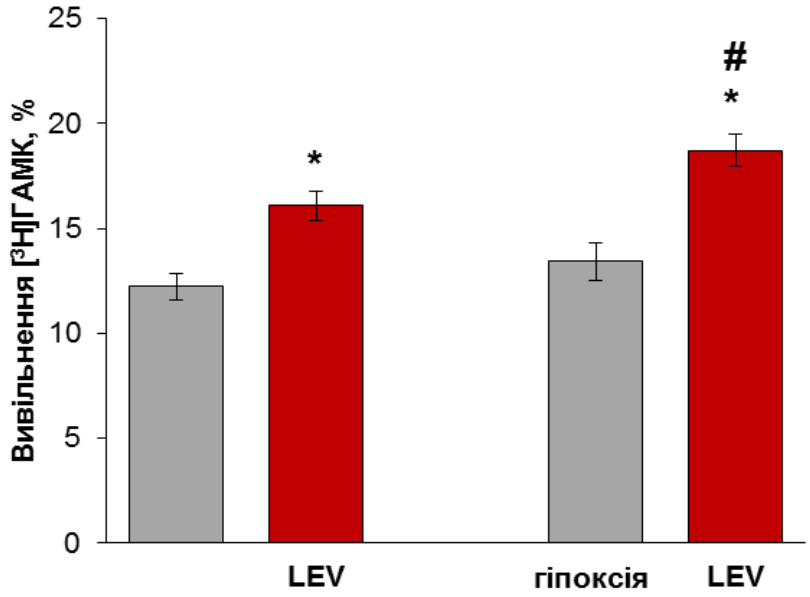


Рис. 3.15. А – Оцінка мембранного потенціалу синаптосом кори головного мозку щурів за умов застосування Леветирацетаму (100 мкМ). Б – Флуоресценція акридинового оранжевого після додавання Леветирацетаму (100 мкМ) та деполяризації мембрани 35 мМ KCl. В – Збільшення сигналу флуоресценції акридинового оранжевого у відповідь на застосування 35 мМ KCl у контролі та після попередньої інкубації синаптосом з ЛЕВ (100 мкМ). Дані представлені як середнє ± SEM.

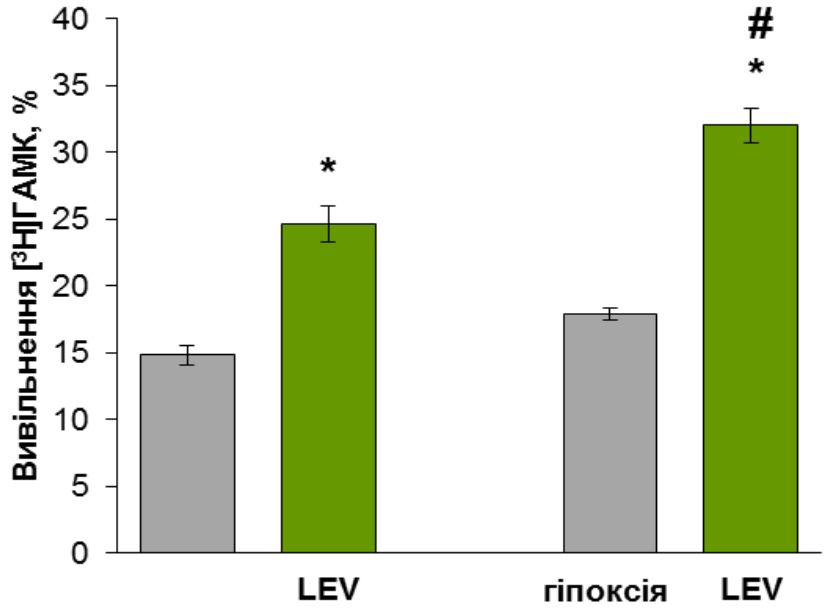
**, $p < 0,01$ відносно контролю.

У наступній серії експериментів було показано, що антиепілептичний препарат Леветирацетам викликає підвищення вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу з нервових терміналей кори, гіпокампу і таламусу головного мозку щурів. Ефективність дії Леветирацетаму підвищується за умов моделі перинатальної гіпоксії (рис. 3.16).

А



Б



В

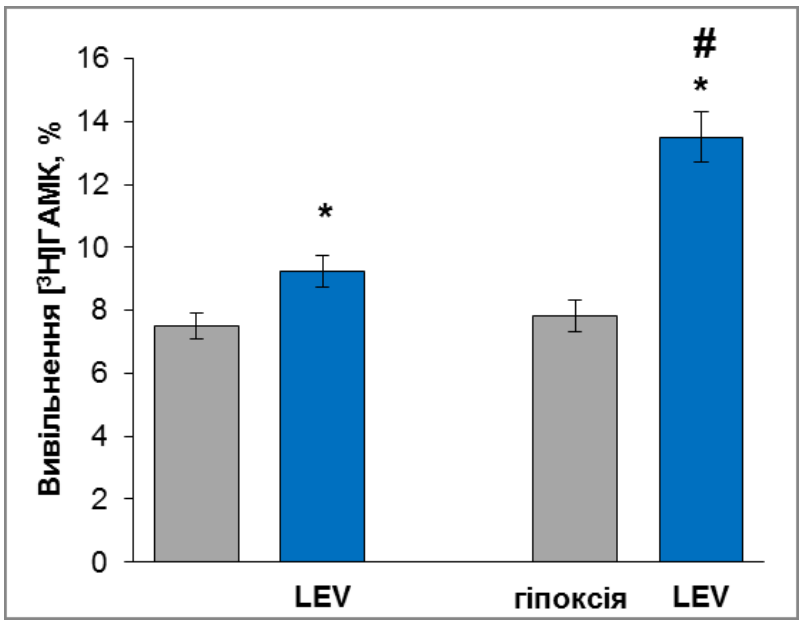


Рис. 3.16. Впливу препарату Леветирацетаму (100 мкМ) на вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу, індукованого калієвою деполяризацією, синаптосомами кори (А), гіпокампу (Б) і таламусу (В) головного мозку щурів у нормі та за умов моделі перинатальної гіпоксії.

*, $P \leq 0,05$ відносно контролю; #, $P \leq 0,05$ відносно ефекту Леветирацетаму у нормі, n=6.

Також було продемонстровано, що антиепілептичний препарат Леветирацетам викликає підвищення вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу з нервових терміналей кори, гіпокампу і таламусу за умов моделі перинатальної гіпоксії протягом всього постнатального розвитку щурів.

Клінічно доведений антиепілептичний ефект Леветирацетаму у пацієнтів та індивідуальна чутливість до препарату досі залишаються нез'ясованими, а точні механізми його дії невідомі. Трансмембранний білок синаптичних везикул SV2A, потенційна мішень дії препарату, експресується в мозку новонароджених щурів та людини та прогресивно зростає до дорослого віку [206]. Він широко присутній у всіх структурах мозку незалежно від фенотипу [207, 208]. У своїх дослідженнях ми демонструємо,

що препарат по-різному діє у гіпокампі, корі і таламусі головного мозку щурів. Кодуюча ділянка білка SV2A була секвенована у 158 пацієнтів з фокальною або генералізованою епілепсією. Пацієнтів розділили на три групи залежно від їхньої відповіді на леветирацетам: ті, хто піддається лікуванню (зниження >75%), ті, у кого спостерігається загострення (збільшення на 50%), і ті, хто не піддається лікуванню.

Нервові закінчення у наших експериментах також демонстрували різну чутливість до препарату, проте ми не розділяли тварин на групи на основі їхньої чутливості до Леветирацетаму під час аналізу даних, а використовували загальні дані у розрахунках. Ми застосовували Леветирацетам у концентрації 100 мкМ, що знаходиться в межах звичайних концентрацій протиепілептичних препаратів у плазмі крові [209, 210], яка, у свою чергу, дуже подібною до концентрації, виміряної у тканинах мозку окремих пацієнтів [211].

3.4. Оцінка можливості модулювання накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях нейроактивними сполуками та наночастинками з метою коригування наслідків перинатальної гіпоксії

3.4.1. Вплив rac-BHFF, нового алостеричного модулятора $GABA_B$ рецепторів, на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів, мембранний потенціал та протонний градієнт синаптичних везикул синаптосом

Проведено оцінку можливості модулювання накопичення та вивільнення ГАМК у нервових терміналях нейроактивними сполуками з метою корегування наслідків перінатальної гіпоксії.

Було проаналізовано вплив rac-BHFF, нового алостеричного модулятора $ГАМК_Б$ рецепторів, на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу та кори головного мозку щурів. Було виявлено, що rac-BHFF

суттєво знижує початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу щурів за концентрації 10 та 30 мкМ, на 12% та 77% відповідно. (рис.3.17).

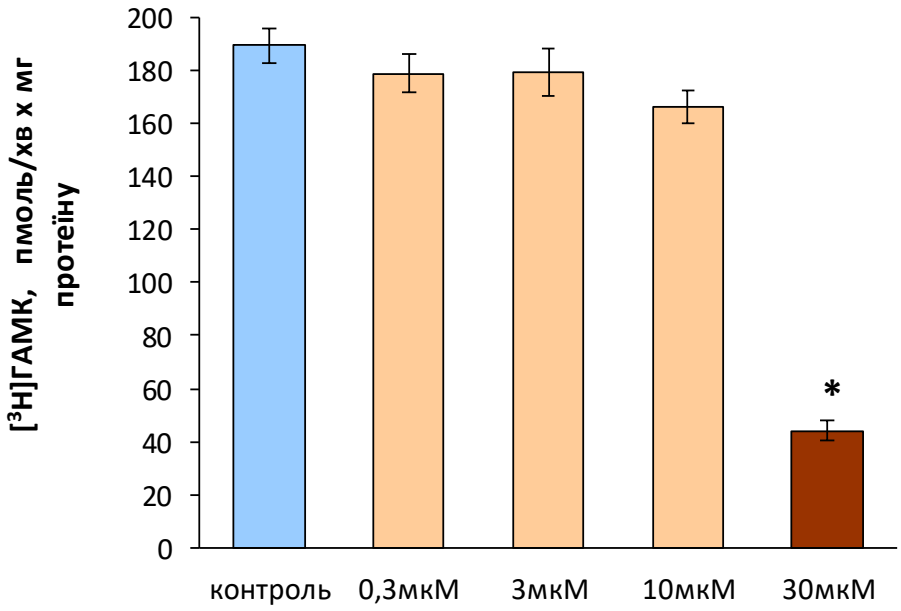
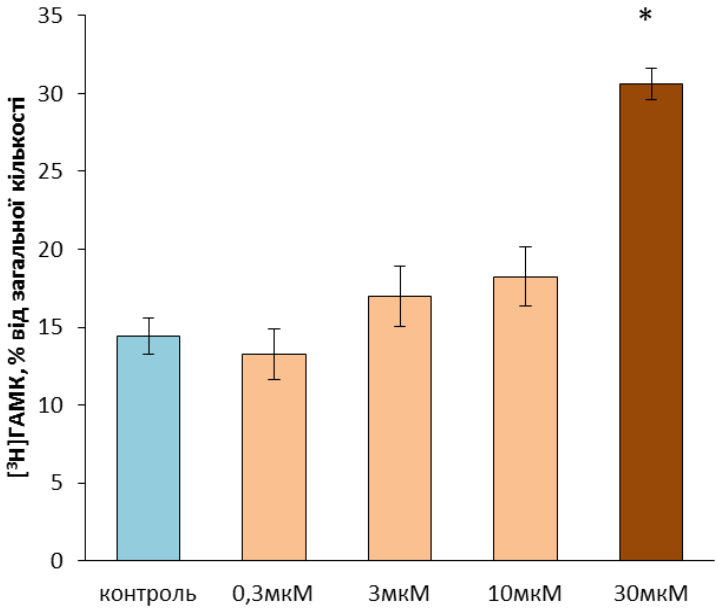


Рис. 3.17. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами гіпокампу щурів за присутності різних концентрацій алостеричного модулятора $GABA_B$ рецепторів rac-BHFF, n=6

Наступним етапом стала оцінака позаклітинного рівню і тонічного вивільнення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори та гіпокампі головного мозку щурів за присутності алостеричного модулятора $ГАМК_Б$ рецепторів, rac-BHFF. Так, було показано, що позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК, який відображає баланс між вивільненням так накопиченням нейромедіатора, значно збільшувався за присутності rac-BHFF (у концентраціях 10-30 мкМ) – з 17% до 30% загальонакумульваної [^{3}H]ГАМК як у корі, так і у гіпокампі. За присутності блокатора ГАМК-транспортера GAT-1, NO-711, показано, що як у корі, так і в гіпокампі rac-BHFF (30 мкМ) збільшує тонічне вивільнення [^{3}H]ГАМК синаптосомами з 21,7% (у контролі) до 29,8% (за присутності блокатора транспортерів ГАМК) (рис.3.18, А, Б).

А



Б

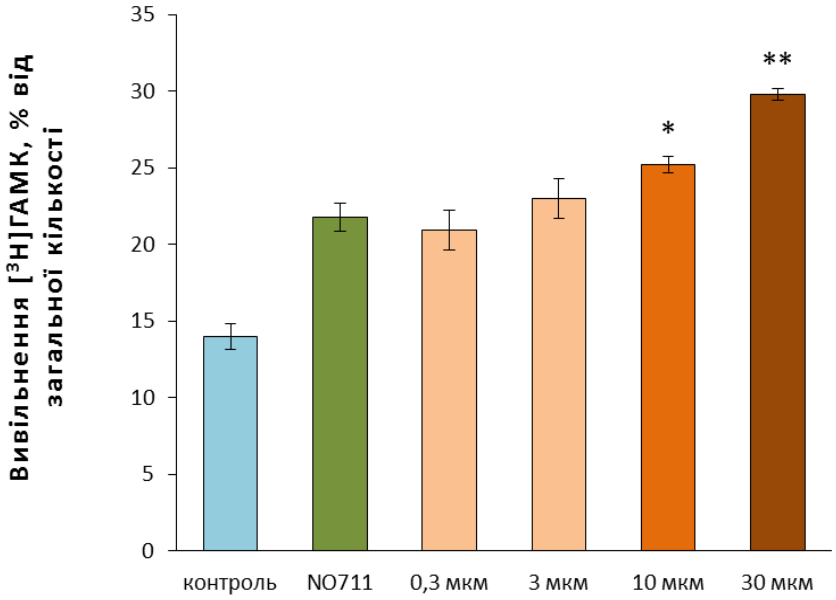


Рис. 3.18. Позаклітинний рівень (А) і тонічне вивільнення [^{3}H]ГАМК (Б) з синаптосом кори головного мозку щурів за присутності алостеричного модулятора ГАМК$_Б$ рецепторів, rac-BHFF, n=6

* – P≤0,05 відносно контролю за присутності 30 мкМ інгібітора транспортерів ГАМК NO-711. За 100 % прийнято загальну кількість акумульованої [^{3}H]ГАМК.

На синаптосомах гіпокампу щурів вперше було показано, що новий алостеричний модулятор ГАМК$_Б$ рецепторів, rac-BHFF викликає дозозалежну деполяризацію плазматичних мембран синаптосом (рис. 3.19).

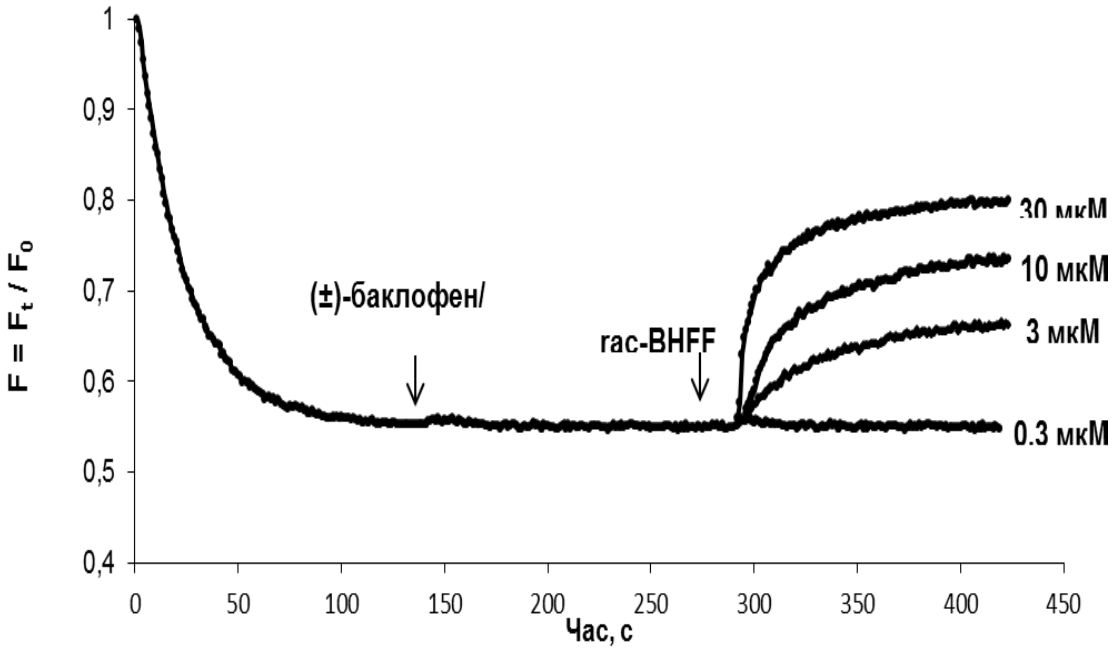


Рис. 3.19. Оцінка мембранного потенціалу синаптосом кори головного мозку щурів за різних концентрацій racBHFF. за допомогою катіонного потенціалчутливого флуоресцентного барвника родаміну 6G;
n=6.

Крім того, вперше було продемонстровано, що новий алостеричний модулятор ГАМК$_Б$ рецепторів, rac-BHFF викликає дозозалежну дисипацію протонного градієнту синаптичних везикул у синаптосомах головного мозку щурів (рис. 3.20).

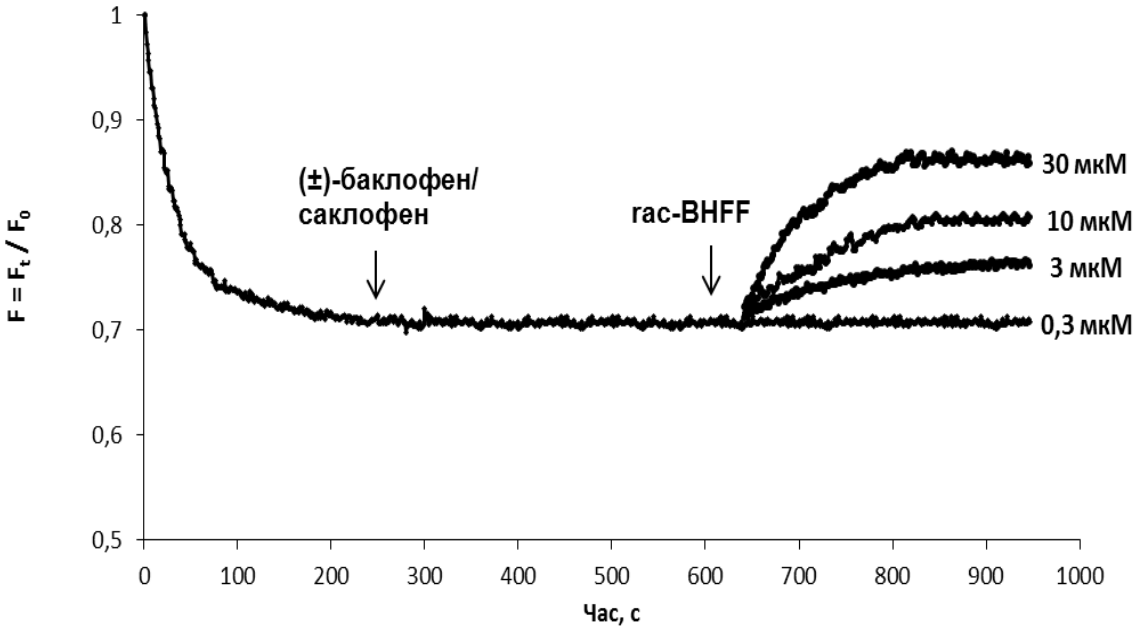


Рис. 3.20. Акумуляція акридинового оранжевого синаптосомами гіпокампу та їх відповідь на аплікацію різних концентрацій rac-BHFF; n=6.

Згідно даних літератури rac-BHFF посилює ефект баклофену, широковідомого агоніста $ГАМК_Б$ рецепторів, що було продемонстровано на різних системах. Так, зокрема, використовуючи кількісну авторадіографію, було показано, що rac-BHFF посилює стимульоване рецепторами $ГАМК_Б$ зв'язування [35S]GTPcS з G-білками в різних ділянках мозку [212] .

У дослідженнях властивості rac-BHFF in vivo на моделі голуба було віднайдено докази того, що ефекти позитивного модулятора рецептора $ГАМК_Б$ не були ідентичними ефектам агоністів рецептора $ГАМК_Б$. Так, позитивна модуляція рецепторів $ГАМК_Б$ не викликала дискримінаційних стимулюючих ефектів, подібних до ефектів бензодіазепінів, алкоголю, кокаїну та нікотину [213, 214] .

Було висловлено припущення, що похідні rac-BHFF можуть служити цінними фармакологічними інструментами для з'ясування патофізіологічної

ролі, яку відіграють рецептори $ГАМК_Б$ у центральній та периферичній нервових системах.

Malherbe та ін. [215] здійснили оцінку посилюючих властивостей rac-BHFF на клітинах яєчників китайського хом'яка (CHO)-Ga16-hGABAB(1a,2a) за допомогою флуорометричного планшетного рідера та аналізів зв'язування GTPg[35S], а також на зрізах гіпокампу щурів за допомогою записів популяційних піків. У аналізах зв'язування GTPg[35S] rac-BHFF збільшував як активність ГАМК, так і ефективність. На моделі мишей in vivo rac-BHFF дозозалежно збільшував втрату рефлексу випрямлення, індуковану баклофеном, а на моделі гіпертермії, індукованої стресом, у мишей rac-BHFF проявляв анксіолітичну активність. На зрізах гіпокампу rac-BHFF посилив інгібування популяційного спайку пірамідальних клітин CA1, індуковане баклофеном. Натомість, під час оцінки ефектів rac-BHFF (10 мкМ) за умов його застосування окремо до зрізів гіпокампу щурів, жодних змін амплітуди популяційного спайку не спостерігалося.

У наших експериментах, незважаючи на зменшення ацидифікації синаптичних везикул, вивільнення [^{3}H]GABA шляхом екзоцитозу також суттєво не змінювалося за концентрації 10 мкМ. Досі залишається абсолютно незрозумілим, чи здатний rac-BHFF сам по собі впливати на екзоцитоз? У цьому контексті полегшений екзоцитоз з одного боку та збіднений вміст синаптичних везикул з іншого боку можуть компенсувати один одного.

3.4.2. Вплив фторовмісного аналогу γ-аміномасляної кислоти із замісником β-CF_2CF_2H на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами головного мозку щурів

Під час першої серії експериментів було досліджено миттєві ефекти фторовмісногу аналогу γ-аміномасляної кислоти із замісником β-CF_2CF_2H,

(*S*)-3 (синтезований у Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України) на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами. На рис.3.21 показано, що аналоги (*S*)-3 за концентрації 100 мкМ не впливає на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК за умов одночасного додавання їх з [^{3}H]ГАМК до синаптосом. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК у контролі складала 205.4±5.0 пмоль/хв × мг протеїну та 194.3±8.0 пмоль/хв × мг протеїну за присутності (*S*)-3. Концентрація фторовмісногу аналогу була підвищена до 200 мкМ, однак ніяких змін у початковій швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК виявлено не було.

Вплив фторовмісногу аналогу був порівняний з ефектом Прегабаліну, який має структуру, подібну до використаного аналогу. Прегабалін за концентрації 100мкМ, за умов одночасного додавання його з [^{3}H]ГАМК до синаптосом, також не впливав на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК, яка складала 210.7 ± 8.0 пмоль/хв× мг протеїну.

Таким чином, не спостерігалось миттєвого ефекту як фторовмісногу аналогу ГАМК, так і ефекту Прегабаліну на накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами.

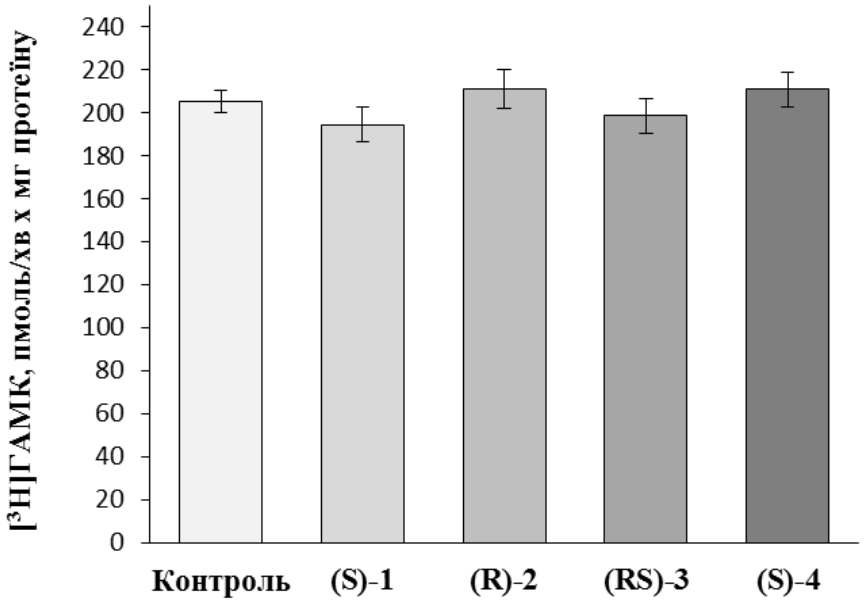


Рис. 3.21. Оцінка миттєвих ефектів фторовмісних аналогів ГАМК (100 мкМ) та Прегабаліну (100 мкМ) на початкову швидкість накопичення [3H]ГАМК. **(S)-3** – фторовмісний аналог ГАМК із замісником β-CF_2CF_2H; **(S)-4** – Прегабалін.

У другій серії експериментів було досліджено вплив (*S*)-3 (100мкМ) після його попередньої інкубації з синаптосомами протягом 20 хвилин. На рис. 3.22. показано незначне підвищення за таких умов початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами. Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК у контролі складала 153.0±7.7 пмоль/хв.х мг протеїну та 188.6± 0.1 пмоль/хв.х мг протеїну за присутності (*S*)-3. За умов підвищення концентрації (*S*)-3 до 200мкМ не було зафіксовано ніяких змін у початковій швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами відносно того ефекту, який спостерігався за умов аплікації 100 мкМ.

Прегабалін, анологічно до (*S*)-3, після попередньої інкубації з синаптосомами протягом 20 хвилин підвищував початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК, яка дорівнювала 182.1 ±8.9 пмоль/хв.х мг протеїну за присутності Прегабаліну.

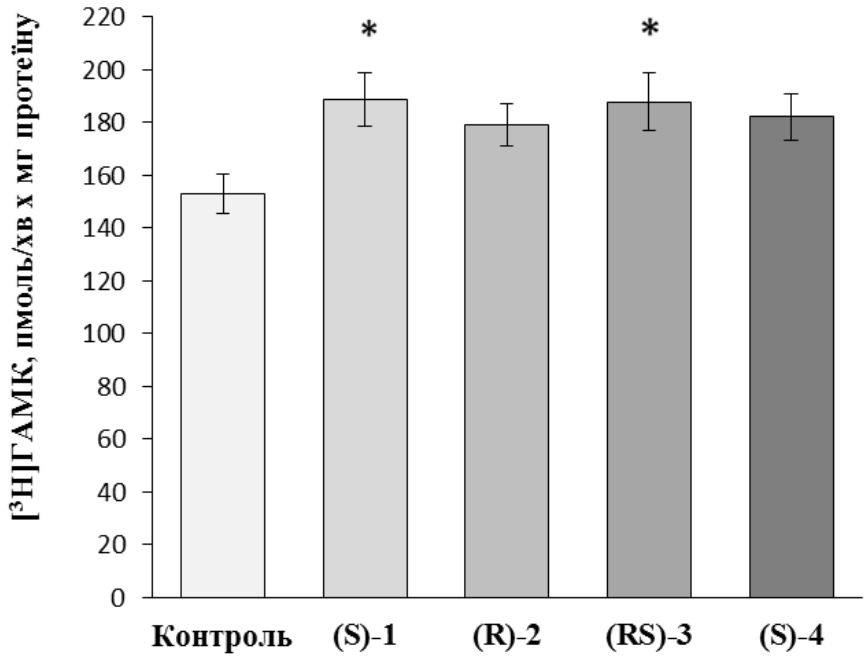


Рис. 3.22. Вплив фторовмісних аналогів ГАМК (100 мкМ) та Прегабаліну (100 мкМ) на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК за умов їх попередньої інкубації з синаптосомами протягом 20 хв. **(S)-3** – фторовмісний аналог ГАМК із замісником β-CF_2CF_2H; **(S)-4** – Прегабалін.
*, P≤0.05 відносно контролю.

З метою з'ясування можливості не однакового впливу фторовмісного аналогу ГАМК, (*S*)-3, на активність різних типів транспортерів ГАМК були використані специфічні інгібітори GAT1 та GAT3 типів транспортерів.

Для дослідження впливу (*S*)-3 на транспортери ГАМК, що не належать до GAT1 типу, було використано широко відомий високоселективний інгібітор GAT1 NO-711. В експериментах з (*S*)-3 синаптосоми преінкубували 10 хв з NO-711, потім до середовища інкубації додавали (*S*)-3 та інкубували ще 20 хв, після чого ініціювали процес транспорту ГАМК додаванням [^{3}H]ГАМК. Таким чином, (*S*)-3 додавали до суспензії синаптосом за умов майже повного незворотнього інгібування транспортерів GAT1 типу. На рис.3.23. продемонстровано ефект (*S*)-3 (100 мкМ) за присутності NO-711 (30

мкМ). Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами, складала 27.9 ± 3.2 пмоль/хв × мг протеїну за присутності (*S*)-3. Таким чином, незважаючи на блокування GAT1-опосередкованого накопичення ГАМК, спостерігалась тенденція до підвищення початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за присутності фторовмісного аналогу ГАМК. Отже, фторовмісні аналоги можуть впливати на активність транспортерів ГАМК, які не належать до GAT1 типу.

Прегабалін (100 мкМ) не впливав на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за умов інгібування транспортерів GAT1 типу, яка складала за його присутності 22.5±2.9 пмоль/хв × мг протеїну.

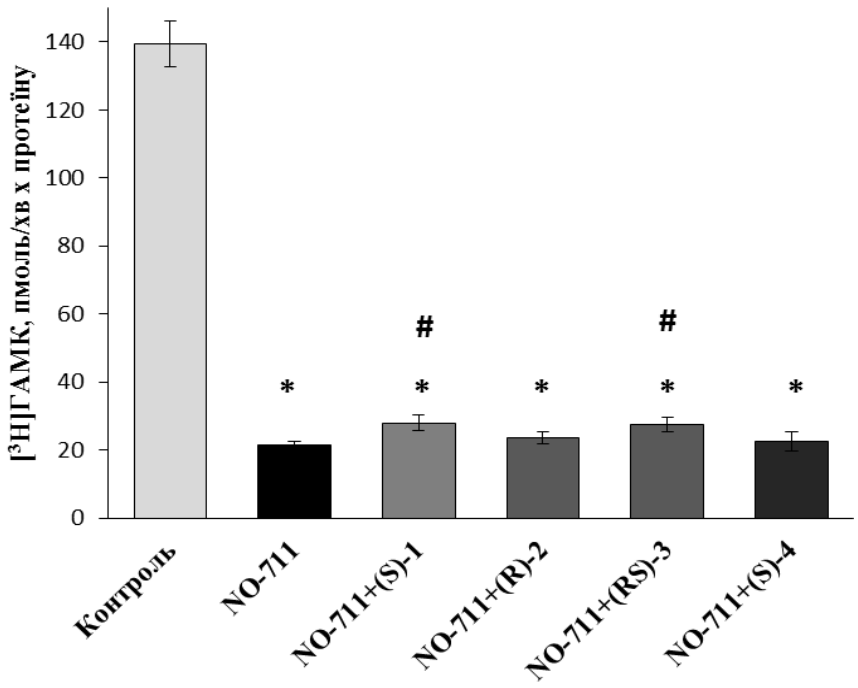


Рис. 3.23. Вплив фторовмісних аналогів ГАМК (100 мкМ) та Прегабаліну (100 мкМ) на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК за умов інгібування транспортерів GAT1 типу. **(S)-3** – фторовмісний аналог ГАМК із замісником β-CF_2CF_2H; **(S)-4** – Прегабалін.

*, P≤0.05 відносно контролю, #, P≤0,05 відносно ефекту Прегабаліну.

Для дослідження впливу фторовмісних аналогів ГАМК на транспортери ГАМК, що вналежать до GAT1 типу, був використаний специфічний інгібітор транспортерів GAT3 типу SNAP5114. На рис. 3.24. продемонстровано ефект (*S*)-3 (100 мкМ) за присутності SNAP5114 (50 мкМ). Початкова швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами, складала 120,3±10,1 пмоль/хв × мг протеїну за присутності (*R*)-1, (*RS*)-2, (*S*)-3 відповідно. Таким чином, за умов блокування GAT3-опосередкованого накопичення ГАМК, спостерігалась тенденція до підвищення початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за присутності (*S*)-3. Отже, фторовмісні аналоги ГАМК можуть впливати і на активність транспортерів ГАМК типу GAT1.

Під впливом Прегабаліну (100 мкМ) також спостерігалась тенденція до підвищення початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за умов інгібування транспортерів GAT3 типу, яка складала за присутності 111,9±9,0 пмоль/хв × мг протеїну.

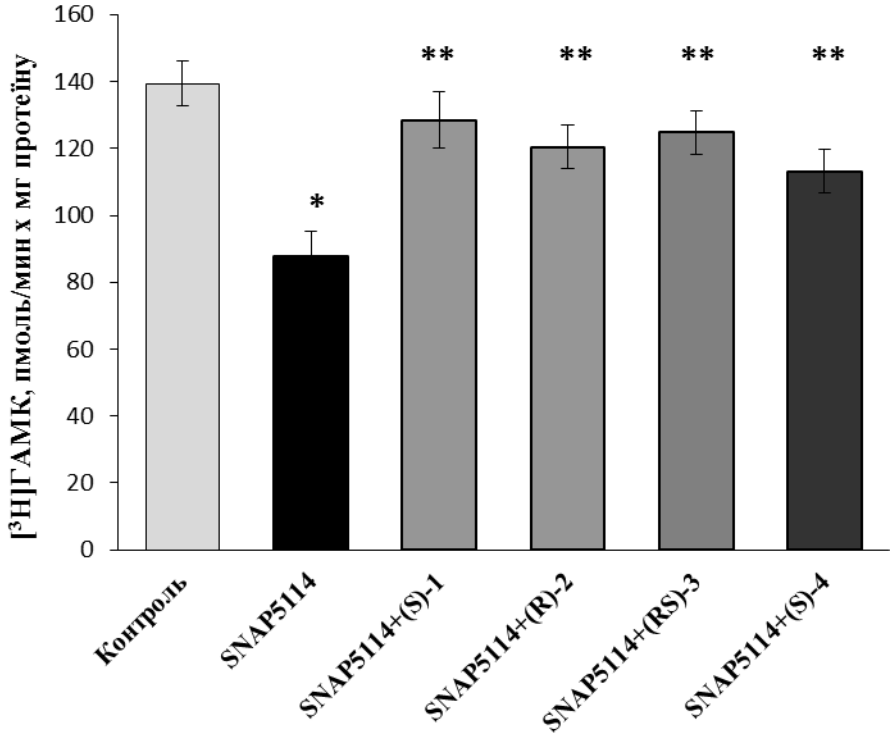


Рис. 3.24. Вплив фторовмісних аналогів ГАМК (100 мкМ) та Прегабаліну (100 мкМ) на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК за умов інгібування транспортерів GAT3 типу. **(S)-3** – фторовмісний аналог ГАМК із замісником β-CF_2CF_2H; **(S)-4** – Прегабалін.
*, P≤0.05 відносно контролю, **, P≤0,05 відносно початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК за умов інгібування транспортерів GAT3 типу.

Фторвмісні аналоги природних речовин відіграють важливу роль у розробці нових біологічно активних сполук [216]. Пошук ефективних препаратів на основі молекули ГАМК показав, що більш ліпофільні аналоги здатні легко подолати гематоенцефалічний бар'єр [217]. Цей факт вказує на перспективу відповідних досліджень в галузі дизайну протисудомних препаратів. Введення гідроксильної групи в С-3 положення в молекулі ГАМК надає речовині здатність до антиконвульсивної активності [218]. Крім того, важливу роль має хіральність молекули. Введення об’ємних ліпофільних замісників в β-положення структурного ядра ГАМК також є одним з важливих чинників, який дозволяє отримати нові ефективні регулятори ГАМК-ергічної системи.

Отже, нами було продемонстровано, що новий фторовмісний аналог ГАМК із замісником β-CF_2CF_2H здатен підвищувати початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК нервовими терміналями головного мозку щурів, і ефект цього аналогу був вище ефекту комерційного препарату Прегабаліну.

Також нами було виявлено, що ефекти фторовмісного аналогу ГАМК (із замісником β-CF_2CF_2H) на початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами були неспецифічними, оскільки спостерігалось підвищення активності транспортерів ГАМК як GAT1, так і GAT3 типів.

Таким чином, введення атомів фтору і невеликих поліфторалкільних груп в молекулу ГАМК збільшує її ліпофільність, і це надає перспективу для

широко застосування у розробці нових біологічно активних сполук та лікарських засобів.

3.4.3. Вплив каліксаренів на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори головного мозку щурів

На цьому етапі дослідження було проведено оцінку впливу каліксаренів (синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України), зокрема, тіакалікс[4]арену С-1193, калікс[4]аренів С-424 та С-425 на ключові характеристики ГАМКергічної нейропередачі у нервових терміналях кори головного мозку щурів.

Було визначено позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей кори головного мозку щурів після додавання різних концентрацій тіакалікса[4]арену С-1193. Показано, що тіакалікса[4]арен С-1193 не впливав на позаклітинний рівень нейромедіатора у діапазоні концентрацій 10-50 мкМ, а підвищення концентрації тіакалікса[4]арену С-1193 у середовищі інкубації до 100 та 200 мкМ призводило до дозо-залежного підвищення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей кори головного мозку щурів (табл 3.2). Дані, отримані з використанням [^{3}H]ГАМК, цілком узгоджуються з даними у наших попередніх дослідженнях щодо змін позаклітинного рівня [^{14}C]глутамату у нервових терміналях кори головного мозку щурів.

Таблиця 3.2

Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей кори головного мозку щурів після додавання різних концентрацій тіакалікса[4]арену С-1193

	Позаклітинний рівень [^{3}H] ГАМК у препаратах нервових терміналей (% від загального накопичення мітки)	F; *p*-величина
Контроль	15.98 ± 0.34	
С-1193, 10 мкМ	15.01 ± 0.54	$F_{(1,22)}$ = 2.51; p = 0.12; n.s.
С-1193, 20 мкМ	15.37 ± 0.55	$F_{(1,22)}$ = 0.99; p = 0.32; n.s.
С-1193, 50 мкМ	16.40 ± 0.37	$F_{(1,22)}$ = 0.79; p = 0.38; n.s.
С-1193, 100 мкМ	17.69± 0.65*	$F_{(1,22)}$ = 5.94; p < 0.05
С-1193, 200 мкМ	22.74 ± 0.50***	$F_{(1,22)}$ = 137.73; p < 0.001

Дані проаналізовано з використанням ANOVA. Дані представлено як середньоарифметичне значення ± стандартна похибка;

n = 12

*, p < 0.05; ***, p < 0.001, n.s. -значних відмінностей відносно контролю не виявлено

Вірогідно, збільшення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК було наслідком індукованої тіакалікса[4]ареном С-1193 деполяризації плазматичної мембрани нервових терміналей кори головного мозку щурів шляхом створення у мембрані йон-провідних структур.

Також була проведена оцінка впливу інших калікс[4]аренів: С-424 та С-425 – на ключові характеристики ГАМКергічної нейропередачі у нервових терміналях кори головного мозку щурів.

Було показано, що калікс[4]арен С-424 не впливав на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у діапазоні концентрацій 10-20 мкМ, проте підвищення концентрації С-424 у середовищі інкубації до 50, 100 та 200 мкМ призводило до дозо-залежного зростання позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей кори головного мозку щурів (табл 3.3).

Таблиця 3.3

Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових закінчень кори головного мозку щурів після додавання до середовища інкубації калікс[4]аренів С-424

	Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК в препаратах нервових закінчень (% від загальної накопиченої мітки)	F; *p*-значення
Контроль	15,63 ± 0,40	
С-424 10 мкМ	15,19 ± 0,48	$F_{(1,22)} = 0,54$; p = 0,46; n.s.
С-424 20 мкМ	15,32 ± 0,43	$F_{(1,22)} = 0,32$; p = 0,57; n.s.
С-424 50 мкМ	17,12 ± 0,46*	$F_{(1,22)} = 6,54$; p < 0,05
С-424 100 мкМ	25,22 ± 0,37***	$F_{(1,22)} = 340,35$; p < 0,001
С-424 200 мкМ	30,95 ± 0,51***	$F_{(1,22)} = 609,01$; p < 0,001

Дані представлені як середнє ± SEM, проаналізовані з використанням one-way ANOVA;

n = 12

*, p < 0,05; ***, p < 0,001, n.s., немає істотних відмінностей відносно контролю

На відміну від калікс[4]арену С-424, калікс[4]арен С-425 не впливав на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у всіх досліджуваних концентраціях від 10 до 200 мкМ (табл 3.4.).

Таблиця 3.4

Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових кори головного мозку щурів після додавання калікс[4]аренів С-425

	Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК в препаратах нервових закінчень (% від загальної накопиченої мітки)	F; *p*- значення
Контроль	16,86 ± 0,45	
С-425 10 мкМ	16,08 ± 0,48	$F_{(1,22)}$ = 1,52; p = 0,23; n.s.
С-425 20 мкМ	16,31 ± 0,41	$F_{(1,22)}$ = 0,87 p = 0,35; n.s.
С-425 50 мкМ	16,05 ± 0,47	$F_{(1,22)}$ = 1,68; p = 0,20; n.s.
С-425 100 мкМ	17,28 ± 0,61	$F_{(1,22)}$ = 0,33; p = 0,57; n.s.
С-425 200 мкМ	17,49 ± 0,52	$F_{(1,22)}$ = 0,93; p = 0,34; n.s.

Дані представлені як середнє ± SEM, проаналізовані з використанням one-way ANOVA;

n = 12

n.s., немає істотних відмінностей відносно контролю

Дані, отримані з використанням [^{3}H]ГАМК у нервових терміналях кори головного мозку щурів, узгоджуються з даними у наших попередніх дослідженнях щодо змін у позаклітинному рівні [^{14}C] глутамату.

Як відомо, деполяризація плазматичної мембрани гладком'язових клітин та синаптосом головного мозку щурів також може бути результатом інгібування Na^+,K^+-АТФази, індукованого калікс[4]ареном [219]. У цьому випадку висока концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} всередині клітин-мішеней може бути досягнута завдяки збільшенню концентрації

внутрішньоклітинного Na^+ після інгібування Na^+,K^+-АТФази та подальшої активації Na^+/Ca^{2+}-обмінника. Цей механізм може бути відповідальним за надмірне, опосередковане калікс[4]аренами, вивільнення нейромедіаторів до синаптичної щілини, зокрема і [^{3}H]ГАМК.

3.4.4. Вплив багатошарових наночастинок графену, легованих азотом, на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах кори головного мозку щурів

Графенові матеріали широко використовуються в різних технологіях і, безумовно, потрапляють у водне та повітряне середовище як компоненти забруднення навколишнього середовища. Наноматеріали з графену, легованого азотом, мають великий потенціал для застосування, зокрема, в накопиченні енергії, як електрохімічні датчики та для очищення стічних вод.

У наших же дослідженнях з метою пошуку нових шляхів корекції порушень транспорту ГАМК у нервових терміналях головного мозку щурів внаслідок перинатальної гіпоксії за допомогою наночастинок різної хімічної природи було проведено оцінку нейротоксичного ризику багатошарового графену, легованого азотом.

Нами було використано багатошарові наночастинки графену, леговані азотом (N-MLG), які синтезовані у Інституті фізичної хімії ім. Л.В.Писаржевського НАН України за допомогою електрохімічного розшарування високочистих графітових стрижнів в електроліті на основі NaN_3. Нейроактивні властивості N-MLG вивчались на ізольованих нервових закінченнях кори головного мозку щурів шляхом аналізу позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК. Оскільки позаклітинний рівень ГАМК є важливою синаптичною характеристикою, що демонструє баланс між поглинанням, опосередкованим ГАМК-транспортерами, і тонічним вивільненням нейромедіатору [220, 221].

Було виявлено, що N-MLG не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у діапазоні концентрацій 0,01–0,5 мг/мл, а збільшення концентрації до 1 мг/мл викликає незначне збільшення (тенденцію до зростання) цього рівня (рис. 3.25).

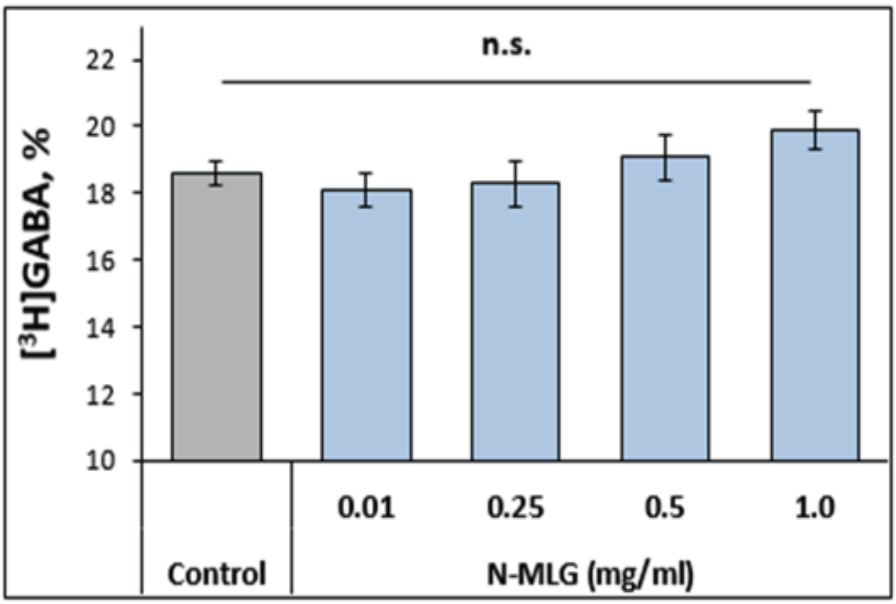


Рис. 3.25. Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах кори головного мозку щурів за присутності N-MLG (0.01–1.0 мг/мл). Дані представлені як середнє ± SEM;

n = 9

n.s., немає істотних відмінностей відносно контролю

Отже, N-MLG немає нейротоксичних ознак та є біосумісним у діапазоні концентрацій 0,01–1 мг/мл.

Графен та його похідні мають потенціал здійснити дуже значний вплив на суспільство завдяки застосуванню в біомедичній галузі. Можливість розробки медичних пристроїв на основі графену на нейронному інтерфейсі

представляє особливий інтерес, що робить вкрай важливим визначення біосумісності графенових матеріалів з нейронними клітинами [222].

Отримані результати дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про молекулярні механізми регуляції ГАМК-ергічної нейротрансмісії в нормі та за патологічних умов, обґрунтовують перспективність цілеспрямованого впливу на ГАМК-транспортну систему та відповідні пресинаптичні механізми як потенційної терапевтичної стратегії при нейрологічних порушеннях, а також створюють підґрунтя для подальшого пошуку нових нейроактивних сполук із коригувальною та нейропротекторною дією.

ВИСНОВКИ

Отримані результати розширюють сучасні уявлення про молекулярні механізми регуляції ГАМК-ергічної нейротрансмісії в нормі та за патологічних умов, обґрунтовують перспективність цілеспрямованого впливу на ГАМК-транспортну систему та відповідні пресинаптичні механізми як потенційної терапевтичної стратегії при нейрологічних порушеннях, а також створюють підґрунтя для подальшого пошуку нових нейроактивних сполук із коригувальною та нейропротекторною дією.

1. Продемонстровано зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами кори і гіпокампу, виділених з мозку щурів через 8-9 тижнів (період досягнення статевої зрілості) після того, як вони зазнали впливу гіпоксії і судом (у віці 10-12 днів після народження) у порівнянні з контрольними щурами, проте у таламусі змін початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами виявлено не було.

2. Показано, що накопичення ГАМК синаптосомами кори, гіпокампу і таламусу знижується відносно 1-го тижня на 2-й, 4-й та 8-й тижні експерименту як у нормі, так і за умов моделі перинатальної гіпоксії. Так, у синаптосомах гіпокампу за умов моделі перинатальної гіпоксії накопичення ГАМК знижується на 20 % та 32 % відносно контрольних тварин на 2-у і 8-у тижнях після гіпоксичного впливу, відповідно. Накопичення ГАМК синаптосомами таламусу підвищується відносно контрольних тварин на 17 % та 49 % на 1-у і 8-у тижнях після гіпоксичного впливу, відповідно. У корі не спостерігалось статистично достовірних змін накопичення ГАМК. Таким чином, ефект гіпоксії на функціонування ГАМК-транспортерів у синаптосомах щурів був найбільш вираженим у гіпокампі.

3. Показано, що здатність β-аланіну інгібувати накопичення ГАМК посилюється у нервових закінченнях гіпокампу і таламусу в результаті перинатальної гіпоксії, в той час як ефективність NO-711 у нервових

закінченнях таламусу знижується. Це може бути наслідком зміни співвідношення активних транспортерів – GAT1/GAT3, експресованих на плазматичній мембрані нервових закінчень після перинатальної гіпоксії. Цей факт вказує на можливість цілеспрямованої модуляції активності транспортера GAT3 та ГАМК-ергічної нейротрансмісії за умов патологічних станів за допомогою екзогенного та ендогенного природного β-аланіну.

4. Продемонстровано, що антиепілептичний препарат Леветирацетам здійснює свій ефект у пресинаптичній ділянці шляхом збільшення вивільнення [^{3}H]ГАМК шляхом екзоцитозу, індукованого калієвою деполяризацією. Препарат не впливає на позаклітинний рівень ГАМК між епізодами екзоцитозу. Дія Леветирацетаму виявилась різною у гіпокампі, корі і таламусі, і ці ефекти змінюються під час розвитку мозку. Препарат не діяв на вивільнення ГАМК синаптосомами головного мозку щурів у дитячому віці. Залежність ефектів Леветирацетаму від віку, показана в нашому дослідженні, є корисною для нової стратегії застосування цього препарату під час терапії дитячої епілепсії. Леветирацетам має більш значний вплив на гіпокампальні, кортикальні і таламічні нервові закінчення саме після перинатальної гіпоксії, ніж у нормі, тому внаслідок гіпоксії ефективність препарату підвищується.

5. Виявлено нові ефекти позитивного алостеричного модулятора ГАМК-Б рецепторів, rac-BHFF. Rac-BHFF викликає дозозалежну деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом та зниження ацидифікації синаптичних везикул, що призводить до зниження початкової швидкості накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами та, як наслідок, підвищення позаклітинного рівня [^{3}H]ГАМК. Таким чином, нові ефекти rac-BHFF на функціонування ГАМК-ергічних нервових закінчень не були пов'язані з модуляцією пресинаптичних рецепторів $GABA_B$. Тому стратегія розробки ліків на основі позитивної алостеричної модуляції GABAB рецепторів має включати в себе усунення вищевказаних побічних ефектів rac-BHFF у

пресинапсі, і навпаки, ці нові властивості алостеричного модулятора можуть бути використані у новітніх підходах.

6. Пошук ефективних препаратів на основі молекули ГАМК показав, що аналоги з більшою ліпофільністю легше долають гематоенцефалічний бар'єр. Введення атомів фтору і невеликих поліфторалкільних груп в молекулу збільшує її ліпофільність, що широко застосовується для розробки нових біологічно активних сполук та лікарських засобів. Порівняльне дослідження ефективності фторвмісного аналогу ГАМК і вже відомого препарату Прегабаліну показало, що аналог із замісником β-CF_2CF_2H і меншою мірою Прегабалін збільшують початкову швидкість накопичення [^{3}H]ГАМК. Ефект фторвмісного аналога ГАМК був вищим за ефект Прегабаліну. Продемонстровано, що синтезована речовина є структурним, але не функціональним аналогом ГАМК.

7. Було виявлено, що калікс[4]арен С-424, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликає деполяризацію синаптосомальної мембрани та збільшує позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей. Калікс[4]арен С-425 не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у всіх досліджуваних концентраціях від 10 до 200 мкМ. На відміну від калікс[4]аренів С-424 та С-425, тіакалікс[4]арен С-1193, починаючи з концентрації 50 мкМ, викликає деполяризацію синаптосомальної мембрани та збільшує позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових терміналей, починаючи з концентрації 100 мкМ.

8. З метою оцінки нейротоксичного ризику багатошарового графену, легованого азотом, (N-MLG), було виявлено, що N-MLG не впливає на позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у синаптосомах головного мозку щурів у діапазоні концентрацій 0,01–0,5 мг/мл, а збільшення концентрації до 1 мг/мл викликало незначне підвищення (тенденцію до зростання) цього рівня. Отже, N-MLG немає нейротоксичних ознак та є біосумісним у діапазоні концентрацій 0,01–1 мг/мл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Borisova T., Dekaliuk M., Pozdnyakova N. et al. Harmful impact on presynaptic glutamate and gaba transport by carbon dots synthesized from sulfur-containing carbohydrate precursor *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 17688–17700 (2017).
2. Borisova T., Krisanova N., Sivko R., Borysov A. Cholesterol depletion attenuates tonic release but increases the ambient level of glutamate in rat brain synaptosomes *Neurochem. Int.*, **3**, 466–478 (2010).
3. Borisova T., Nazarova A., Dekaliuk M. et al. Neuromodulatory properties of fluorescent carbon dots: effect on exocytotic release, uptake and ambient level of glutamate and gaba in brain nerve terminals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 203–15 (2015).
4. Danbolt N. C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, **1**, 1–105 (2001).
5. 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. - P. 1013-23.
6. Krisanova NV, Trikash IO, Borisova TA. Synaptopathy under conditions of altered gravity: Changes in synaptic vesiclefusion and glutamate release // Neurochem Int. – 2009. – Vol. 55. – P. 724–31.
7. Borden LA. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization // Neurochem Int. – 1996. – Vol. 29. – P. 335-56.
8. Richerson GB, Wu Y. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore// J Neurophysiol. – 2003. – Vol. – 90. – P. 1363-74.

9. 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. – P. 250-58. doi: 10.3325/cmj.2014.55.250.

10. Dalby NO. Inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures // Eur J Pharmacol. – 2003. – Vol. – 479. – Vol. 127-37.

11. Richerson G. B, Wu Y. Role of GABA transporter in epilepsy // Adv Exp Med Biol. – 2004. – Vol. 548. – P. 76-91.

12. Pozdnyakova N, Yatsenko L, Parkhomenko N, Himmelreich N. Perinatal hypoxia induces long-lasting increase in unstimulated GABA release in rat brain cortex and hippocampus. The protective effect of pyruvate // Neurochem Int. - 2011. – Vol. 58. – P. 14-21.

13. Yatsenko L, Pozdnyakova N, Dudarenko M, Himmelreich N. The dynamics of changes in hippocampal GABAergic system in rats exposed to early-life hypoxia-induced seizures // Neurosci Lett. – 2012. – Vol. 524. – P. 69-73.

14. Wei Z-Y, Knaus E.E. Asymmetric Synthesis of (*S*)-Vigabatrin. An approach using methionine as the chiral pool // Synlett 1993. – Vol. 4. – P. 295–6. DOI: 10.1055/s-1993-22438.

15. Felluga F, Gombac V, Pitacco G, Valentin E. A short and convenient chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of 3-phenylGABA and 3-(4-chlorophenyl) GABA (Baclofen) // Tetrahedron: Asymmetry.- 2005. – Vol. 16. – P. 1341–45. DOI: 10.1016/j.tetasy.2005.02.019.

16. Bryans J.S, Wustrow D.J. 3-substituted GABA analogs with central nervous system activity: A review // Med Res Rev. – 1999. – Vol. 19. – P. 149–77.

17. Belliotti T.R, Capiris T, Ekhato I.V, Kinsora J.J, Field M.J, Heffner T.G, et al. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the α2-δ protein // J Med Chem. – 2005. – Vol. 48. - P. 2294–2307.

18. Silverman R.B. From basic science to blockbuster drug: The discovery of Lyrica // Angew Chem Int Ed. – 2008. Vol. 47. – P. 3500-4. DOI: 10.1002/anie.200704280.

19. Kauppinen R. A., Sihra T. S., Nicholls D. G. Aminooxyacetic acid inhibits the malate-aspartate shuttle in isolated nerve terminals and prevents the mitochondria from utilizing glycolytic substrates // Biochim Biophys Acta. – 1987. – Vol.930. – P.173-178.

20. Martin D. L., Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain // J Neurochem. – 1993. – Vol.60. – P.395-407.

21. Phillippu A., Schumann H. J. Der Einfluss von Calciun und die Brenzca techinaminefreisetzung // Experientia. – 1962. – Vol. 18. – P. 138-140.

22. Cooke J. D., Okamoto K., Quastel J. The role of calcium in depolarization-secretion coupling at the motor nerve terminals // Physiol. – 1973. – Vol. 228. – P. 459-497.

23. Hachiya Y., Takashima S. Development of GABAergic neurons and their transporter in human temporal cortex. // Pediatr Neurol. – 2001. –P.390-396.

24. Roberts E. Disinhibition as an organizing principle in the nervous system. The role of gamma-aminobutyric acid // Adv Neurol. – 1974. – Vol.5. – P.127-143.

25. Conti F., Minelli A., Melone M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications // Brain Res Brain Res Rev. – 2004. – Vol.45. – P.196-212.

26. Gadea A., López-Colomé A. M. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: GABA transporters // J Neurosci Res. – 2001. – Vol.63. – P.461-468.

27. Freund T. F., Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus // Hippocampus. – 1996. – Vol.6. – No.4. – P.347-470.

28. Freund T. F., Gulyas A. I. Inhibitory control of GABA-ergic interneurons in the hippocampus // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1997. – Vol.75. – No.5. – P.479-487.

29. Scanziani M., Gahwiler B. H, Charpak S. Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol.95. – P.12004-12009.

30. Miles R., Toth K., Gulyas A. I. et al. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus // Neuron. – 1996. – Vol.16. – P.815-823.

31. Poncer J. C., McKinney R. A., Gahwiler B. H. et al. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses // Neuron. – 1997. – Vol.18. – P.463-472.

32. Brickley S. G., Cull-Candy S. G., Farrant M. Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA-A receptors // J. Physiol. – 1996. – Vol.497. – P.753-759.

33. Wall M. J., Usowicz M. M. Development of action potentialdependent and independent spontaneous GABA-A receptor-mediated currents

in granule cells of postnatal rat cerebellum // Eur. J. Neurosci. – 1997. – Vol.9. – P.533-548.

34. Salin P. A., Prince D. A. Spontaneous GABA-A receptormediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex // J. Neurophysiol. – 1996. – Vol.75. – P.1573-1588.

35. Liu Q. Y., Vautrin J., Tang K. M. et al. Exogenous GABA persistently opens Cl^- channels in cultured embryonic rat thalamic neurons // J. Membrane Biol. – 1995. – Vol.145. – P.279-284.

36. Bai D., Zhu G., Pennefather P. et al. Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons // Mol. Pharmacol. – 2001. – Vol.59. – P.814-824.

37. Otis T. S., Staley K. J., Mody I. Perpetual inhibitory activity in mammalian brain slices generated by spontaneous GABA release // Brain Res. – 1991. – Vol.545. – P.142-150.

38. Bernard C., Cossart R., Hirsch J. C. et al. What is GABA-ergic inhibition? How is it modified in epilepsy? // Epilepsia. – 2000. – Vol.41. – P.90-95.

39. Cossart R., Dinocourt C., Hirsch J. C. et al. Dendritic but not somatic GABA-ergic inhibition is decreased in experimental epilepsy // Nat. Neurosci. – 2001. – Vol.4. – P.52-62.

40. Waagepetersen H. S., Sonnewald U., Schousboe A. The GABA paradox: Multiple roles as metabolite, neurotransmitter and neurodifferentiative agent // J Neurochem. – 1999. – No.73. – P.1335-1342.

41. Fritschy J. M. Epilepsy, E/I Balance and GABA(A) Receptor Plasticity // Front Mol Neurosci. – 2008. – Vol.1. – P.5-8.

42. Wasterlain C. G., Farber D. B., Fairchild M. D. Synaptic mechanisms in the kindled epileptic focus: a speculative synthesis // Adv Neurol. – Vol.44. - 1986. – P.411-433.

43. Hoogland G. et al. Synaptosomal glutamate and GABA transport in patients with temporal lobe epilepsy // J Neurosci Res. – 2004. – Vol.76. – P.81-90.

44. Schousboe A., Kanner B. GABA transporters: Functional and pharmacological properties. In: Glutamate and GABA Receptors and Transporters; Structure, Function and Pharmacology // London: Taylor and Francis. – 2002. – Vol.43. – P.337-349.

45. Sepkuty J. P. et al. A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy // J Neurosci. – 2002. – Vol.22. – P.6372-6379.

46. Kauppinen R. A., Nicholls D. G. Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia // Eur J Biochem. – 1986. – Vol.158. – P.159-165.

47. Wu M. et al. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells // Am J Physiol Cell Physiol. – 2007. – Vol.292. – P.125-136.

48. Levin S. G., Godukhin O. V. Changes in the Excitability of Pyramidal Neurons in Hippocampal Slices from Aged Rats in Conditions of Periodic Transient Episodes of Hypoxia // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2005. – Vol.35. – N.9. – P.937-941.

49. Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A. The model of pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects // Epilepsy Res. – 1996. – P.93-103.

50. Parent J. M. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair // Epilepsy Res. – 2002. – P.179-189.

51. Joseph J. Volpe Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection // Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews. – 2001. – Vol.7. – Issue 1. – P.56 – 64.

52. Jensen F. E. et al. Acute and Chronic Increases in Excitability in Rat Hippocampal Slices After Perinatal Hypoxia In Vivo // J Neurophysiol. – 1998. – Vol.79. – №1. – P.73-81.

53. Bunik V. I., Raddatz G., Wanders R., Reiser G. Brain pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes are mitochondrial targets of the CoA ester of the Refsum disease marker phytanic acid // FEBS Lett. – 2006. –Vol.580. – P.3551-3557.

54. Fountain N. B. Status epilepticus: risk factors and complications // Epilepsia. – 2000. – Vol.41. – P.23-30.

55. Sorg AL, von Kries R, Borggraefe I. Cognitive disorders in childhood epilepsy: a comparative longitudinal study using administrative healthcare data. J Neurol. 2022 Jul;269(7):3789-3799. doi: 10.1007/s00415-022-11008-y.

56. Sheryl R. Haut, Jana Veliškova, Solomon L. Moshé Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects // The Lancet Neurology. – 2004. – Vol.3, Issue 10. – P.608-617.

57. Wasterlain C. G., Fujikawa D. G., Penix L., Sankar R. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus // Epilepsia. – 1993. – Vol.34. – P.37-53.

58. Bunik V. I. et al. Enzyme-Catalyzed Side Reactions with Molecular Oxygen May Contribute to Cell Signaling and Neurodegenerative

Diseases // Neurochemical Research. – 2007. – Vol.32. – P.871-891

59. Siesjö B. K., Wieloch T. Epileptic brain damage: pathophysiology and neurochemical pathology // Adv Neurol. – 1986. – Vol.44. – P.813-847.

60. Cavalheiro E. A. , Fernandes M. J., Turski L., Naffah-Mazzacoratti M. G. Spontaneous Recurrent Seizures in Rats: Amino Acid and Monoamine Determination in the Hippocampus // Epilepsia. – 1994. – Vol.35. – P.1-11.

61. Plessis, Adre J., Joseph J. Volpe Perinatal brain injury in the preterm and term newborn // Current Opinion in Neurology – 2002. – Vol.15. – Issue 2. – P.151-157.

62. Sas K. et al. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders // J Neurol Sci. – 2007. – Vol.257. – P.221-239.

63. Lizaveta I. Bon, Fliuryk S, Dremza I, Bon E, Maksimovich N, et al (2023), Hypoxia of the Brain and Mechanisms of its Development, J Clinical Research and Reports, 13(4); DOI:10.31579/2690-1919/311

64. Owens J., Robbins C. A., Wenzel H. J., Schwartzkroin P. A. Acute and chronic effects of hypoxia on the developing hippocampus Impact factor // Annals of Neurology. – 1997. – Vol.41. – P.187-199.

65. Jensen F. E., Applegate C. D., Holtzman D. et al. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain // Ann. Neurol. – 1991. – Vol.29. – P.629-637.

66. Vásquez Vélez IC, Charris Domínguez CM, Fernández Sánchez MJ, Garavito-Aguilar ZV. Hypoxia and Tissue Regeneration: Adaptive Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Int J Mol Sci. 2025

Sep 23;26(19):9272. doi: 10.3390/ijms26199272. PMID: 41096544; PMCID: PMC12524353.

67. Hertz L (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective, Neuropharmacology, 55, 289–309, doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023.

68. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia J Exp Biol (2001) 204 (18): 3171–3181. doi.org/10.1242/jeb.204.18.3171.

69. Vergara RC, Jaramillo-Riveri S, Luarte A, Moënne-Loccoz C, Fuentes R, Couve A, Maldonado PE. The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. Front Comput Neurosci. 2019 Jul 23;13:49. doi: 10.3389/fncom.2019.00049.

70. Gao, Z.; Lei, W.I.; Lee, L.T.O. The Role of Neuropeptide-Stimulated cAMP-EPACs Signalling in Cancer Cells. Molecules 2022, 27, 311. https://doi.org/10.3390/molecules27010311.

71. Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 Mar;300(3):C385-93. doi: 10.1152/ajpcell.00485.2010.

72. Newby EA, Myers DA, Ducsay CA. Fetal endocrine and metabolic adaptations to hypoxia: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015 Sep 1;309(5):E429-39. doi: 10.1152/ajpendo.00126.2015.

73. Seal, S.V.; Turner, J.D. The 'Jekyll and Hyde' of Gluconeogenesis: Early Life Adversity, Later Life Stress, and Metabolic Disturbances. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3344. https://doi.org/10.3390/ijms22073344.

74. Li S, Hafeez A, Noorulla F, Geng X, Shao G, Ren C, Lu G, Zhao H, Ding Y, Ji X. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to

ischemia. Prog Neurobiol. 2017 Oct;157:79-91. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.001.

75. Cairns SP, Lindinger MI. Lactic acidosis: implications for human exercise performance. Eur J Appl Physiol. 2025 Jul;125(7):1761-1795. doi: 10.1007/s00421-025-05750-0.

76. Lee TY. Lactate: a multifunctional signaling molecule. Yeungnam Univ J Med. 2021 Jul;38(3):183-193. doi: 10.12701/yujm.2020.00892.

77. Baddam S., Tubben R.E. Lactic Acidosis. 2025 Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK470202/

78. Vavřička J, Brož P, Follprecht D, Novák J, Kroužecký A. Modern Perspective of Lactate Metabolism. Physiol Res. 2024 Aug 31;73(4):499-514. doi: 10.33549/physiolres.935331.

79. Milliken AS, Ciesla JH, Nadtochiy SM, Brookes PS. Distinct effects of intracellular vs. extracellular acidic pH on the cardiac metabolome during ischemia and reperfusion. J Mol Cell Cardiol. 2023 Jan;174:101-114. doi: 10.1016/j.yjmcc.2022.11.008.

80. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. EXS. 1996;76:99-114. doi: 10.1007/978-3-0348-8988-9_7.

81. M. Tóth, O.; Menyhárt, Á.; Frank, R.; Hantosi, D.; Farkas, E.; Bari, F. Tissue Acidosis Associated with Ischemic Stroke to Guide Neuroprotective Drug Delivery. Biology 2020, 9, 460. https://doi.org/10.3390/biology9120460.

82. Kraig RP. Acid-induced injury in elasmobranch brain. Neurosci Lett. 1988 Jul 19;90(1-2):119-24. doi: 10.1016/0304-3940(88)90797-5.

83. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids. 2009 May;37(1):1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

84. Ghimire P, Dhamoon AS. Ketoacidosis. 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534848/

85. Morhardt L (2025). Ketone Bodies and Their Systemic Effects on Energy Regulation. Diabetes Case Rep. 10:251.

86. Puchalska P, Crawford PA. Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease. Annu Rev Nutr. 2021 Oct 11;41:49-77. doi: 10.1146/annurev-nutr-111120-111518.

87. Zhang X, Wu W, Li Y, Peng Z. Exploring the role and therapeutic potential of lipid metabolism in acute kidney injury. Ren Fail. 2024 Dec;46(2):2403652. doi: 10.1080/0886022X.2024.2403652.

88. Collins F, Schmidt MF, Guthrie PB, Kater SB. Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. J Neurosci. 1991 Aug;11(8):2582-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-08-02582.1991.

89. Weiss JN, Qu Z, Shivkumar K. Electrophysiology of Hypokalemia and Hyperkalemia. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2017 Mar;10(3):e004667. doi: 10.1161/CIRCEP.116.004667.

90. Lawrence L. Spriet. 1991. Phosphofructokinase activity and acidosis during short-term tetanic contractions. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 69(2): 298-304. https://doi.org/10.1139/y91-046.

91. Chen X, Zhang Y, Wang H, Liu L, Li W, Xie P. The regulatory effects of lactic acid on neuropsychiatric disorders. Discov Ment Health. 2022 Mar 30;2(1):8. doi: 10.1007/s44192-022-00011-4.

92. Wei M, Liu C, Jing W, Liu Q, Wei L, Li X, Wang J, Du X. The role of lactate and lactylation in ischemic stroke. Int

Immunopharmacol. 2025 Nov 14;165:115502. doi: 10.1016/j.intimp.2025.115502.

93. Kamel KS, Oh MS, Halperin ML. L-lactic acidosis: pathophysiology, classification, and causes; emphasis on biochemical and metabolic basis. Kidney Int. 2020 Jan;97(1):75-88. doi: 10.1016/j.kint.2019.08.023.

94. Zoremba N, Homola A, Rossaint R, Syková E. Interstitial lactate, lactate/pyruvate and glucose in rat muscle before, during and in the recovery from global hypoxia. Acta Vet Scand. 2014 Nov 13;56(1):72. doi: 10.1186/s13028-014-0072-0.

95. Liu, H., Wang, S., Wang, J. et al. Energy metabolism in health and diseases. Sig Transduct Target Ther 10, 69 (2025). https://doi.org/10.1038/s41392-025-02141-x.

96. Peluffo RD, Hernández JA. The Na^+,K^+-ATPase and its stoichiometric ratio: some thermodynamic speculations. Biophys Rev. 2023 Jul 17;15(4):539-552. doi: 10.1007/s12551-023-01082-5.

97. Contreras, R.G.; Torres-Carrillo, A.; Flores-Maldonado, C.; Shoshani, L.; Ponce, A. Na+/K+-ATPase: More than an Electrogenic Pump. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 6122. https://doi.org/10.3390/ijms25116122.

98. Khanna A, Kahle KT, Walcott BP, Gerzanich V, Simard JM. Disruption of ion homeostasis in the neurogliovascular unit underlies the pathogenesis of ischemic cerebral edema. Transl Stroke Res. 2014 Feb;5(1):3-16. doi: 10.1007/s12975-013-0307-9.

99. de Lores Arnaiz GR, Ordieres MG. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. Int J Biomed Sci. 2014 Jun;10(2):85-102.

100. Kaplan-Arabaci O, Acari A, Ciftci P and Gozuacik D (2022) Glutamate Scavenging as a Neuroreparative Strategy in Ischemic

Stroke. Front. Pharmacol. 13:866738. doi: 10.3389/fphar.2022.866738.

101. Belenichev I, Bukhtiyarova N, Ryzhenko V, Makyeyeva L, Morozova O, Oksenych V, Kamyshnyi O. Methodological Approaches to Experimental Evaluation of Neuroprotective Action of Potential Drugs. Int J Mol Sci. 2024 Sep 28;25(19):10475. doi: 10.3390/ijms251910475.
102. Wu WL, Gong XX, Qin ZH, Wang Y. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases-an update. Acta Pharmacol Sin. 2025 Dec;46(12):3129-3142. doi: 10.1038/s41401-025-01576-w.
103. Cellot G, Ballerini L. Interplay Among Synaptic Glutamate Release and Excitotoxicity: Neuronal Damage and Graphene-Based Materials Related Protection. Life (Basel). 2025 Nov 19;15(11):1776. doi: 10.3390/life15111776.
104. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015;2015:964518. DOI: 10.1155/2015/964518.
105. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol Sin. 2009 Apr;30(4):379-87. doi: 10.1038/aps.2009.24.
106. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca2+ release. Trends Pharmacol Sci. 1995 Oct;16(10):356-9. doi: 10.1016/s0165-6147(00)89070-7.
107. Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hacein-Bey L. Pictorial review of glutamate

excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. AJNR Am J Neuroradiol. 2001 Nov-Dec;22(10):1813-24.

108. Javadov S, Chapa-Dubocq X, Makarov V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. Mitochondrion. 2018 Jan;38:58-70. doi: 10.1016/j.mito.2017.08.004.

109. Belenichev, I.; Popazova, O.; Bukhtiyarova, N.; Ryzhenko, V.; Pavlov, S.; Suprun, E.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Ischemia: Advances in Pharmacological Interventions. *Antioxidants* 2025, *14*, 108. https://doi.org/10.3390/antiox14010108.

110. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. Physiological Reviews 1999 79:4, 1431-1568 10.1152/physrev.1999.79.4.1431.

111. Belenichev, I.; Popazova, O.; Bukhtiyarova, N.; Ryzhenko, V.; Pavlov, S. V.; Suprun, E.; Oksenych, V.; Kamyshnyi, O. Formation of Mitochondrial Dysfunction of Nerve Cells in Cerebral Ischemia and Possibilities of Pharmacological Correction. Preprints 2024, 2024121813. https://doi.org/10.20944/preprints202412.1813.v1.

112. Holger K. Eltzschig, Linda F. Thompson, Jorn Karhausen, Richard J. Cotta, Juan C. Ibla, Simon C. Robson, Sean P. Colgan; Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. Blood 2004; 104 (13): 3986–3992. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2066.

113. Zhang, Y., Tan, J., Miao, Y. et al. The effect of extracellular vesicles on the regulation of mitochondria under hypoxia. Cell Death Dis 12, 358 (2021). https://doi.org/10.1038/s41419-021-03640-9.

114. Leu, J.-G.; Wang, C.-M.; Chen, C.-Y.; Yang, Y.-F.; Shih, C.-Y.; Lin, J.-T.; Chen, H.-M.; Liang, Y.-J. The Cell Protective Effect of

Adenine on Hypoxia–Reoxygenation Injury through PPAR Delta Activation. Life 2021, 11, 1408. https://doi.org/10.3390/life11121408.

115. Rivkees, S., Wendler, C. Adverse and Protective Influences of Adenosine on the Newborn and Embryo: Implications for Preterm White Matter Injury and Embryo Protection. Pediatr Res 69, 271–278 (2011). https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31820efbcf.

116. Tinton S, Buc-Calderon P. Inhibition of protein synthesis induced by adenine nucleotides requires their metabolism into adenosine. Biochem Pharmacol. 1995 Aug 8;50(4):481-8. doi: 10.1016/0006-2952(95)00163-t.

117. Wang C, Zhai J, Zhou X, Chen Y. Lipid metabolism: Novel approaches for managing idiopathic epilepsy. Neuropeptides. 2024 Dec;108:102475. doi: 10.1016/j.npep.2024.102475.

118. Bazan NG, Birkle DL, Tang W, Reddy TS. The accumulation of free arachidonic acid, diacylglycerols, prostaglandins, and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. Adv Neurol. 1986;44:879-902. PMID: 3010683.

119. Rihn, L.L., Visioli, F., Rodriguez de Turco, E.B., Kreisman, N.R., Bazan, N.G. (1992). Free Fatty Acid and Diacylglycerol Levels are Related to Cerebral O_2 During Seizures. In: Globus, M.YT., Dietrich, W.D. (eds) The Role of Neurotransmitters in Brain Injury. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3452-5_37.

120. Visioli F, Rodriguez de Turco EB, Kreisman NR, Bazan NG. Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. Metab Brain Dis. 1994 Jun;9(2):161-70. doi: 10.1007/BF01999769.

121. Suo JL, Li JY, Zhou CM, Jin RL, Song JH, Wang YL, Huo DS, Tan BH, Li YC. Long-term changes in phospholipids and free fatty acids and the possible subcellular origins for phospholipid degradation in kainic acid-damaged mouse hippocampus. Brain Res. 2024 Dec 15;1845:149243. doi: 10.1016/j.brainres.2024.149243.

122. Turker S, Severcan M, Ilbay G, Severcan F. Epileptic seizures induce structural and functional alterations on brain tissue membranes. Biochim Biophys Acta. 2014 Dec;1838(12):3088-96. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.08.025.

123. Rodriguez de Turco EB, Morelli de Liberti S, Bazan NG. Stimulation of free fatty acid and diacylglycerol accumulation in cerebrum and cerebellum during bicuculline-induced status epilepticus. Effect of pretreatment with alpha-methyl-p-tyrosine and p-chlorophenylalamine. J Neurochem. 1983 Jan;40(1):252-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1983.tb12679.x.

124. Rho JM, Boison D. The metabolic basis of epilepsy. Nat Rev Neurol. 2022 Jun;18(6):333-347. doi: 10.1038/s41582-022-00651-8.

125. Frańczak M, Gargaś J, Sypecka J. Mitochondria as a therapeutic target in neurodegeneration caused by hypoxia and ischemia during the perinatal period. Pharmacol Rep. 2026 Feb;78(1):1-26. doi: 10.1007/s43440-025-00819-1.

126. R. G. Boutilier; Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol 15 September 2001; 204 (18): 3171–3181. doi: https://doi.org/10.1242/jeb.204.18.3171.

127. Kickinger S, Lie MEK, Suemasa A, Al-Khawaja A, Fujiwara K, Watanabe M, Wilhelmsen KS, Falk-Petersen CB, Frølund B, Shuto S, Ecker GF and Wellendorph P (2021) Molecular Determinants and Pharmacological Analysis for a Class of Competitive Non-

transported Bicyclic Inhibitors of the Betaine/GABA Transporter BGT1. Front. Chem. 9:736457. doi: 10.3389/fchem.2021.736457.

128. Mortensen, J. S., Mikkelsen, A. N. L., & Wellendorph, P. (2024). Ways of modulating GABA transporters to treat neurological disease. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 28(7), 529–543. https://doi.org/10.1080/14728222.2024.2383611.

129. Kickinger, S., Al-Khawaja, A., Haugaard, A.S. et al. Exploring the molecular determinants for subtype-selectivity of 2-amino-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid analogs as betaine/GABA transporter 1 (BGT1) substrate-inhibitors. Sci Rep 10, 12992 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-69908-w.

130. Zhou Y, Danbolt NC. GABA and Glutamate Transporters in Brain. Front Endocrinol (Lausanne). 2013 Nov 11;4:165. doi: 10.3389/fendo.2013.00165.

131. Bröer S. and Rudnick G., (2025). SLC6 neurotransmitter transporter family in GtoPdb v.2025.3. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE, 2025(3). https://doi.org/10.2218/gtopdb/F144/2025.3.

132. Kamil Łątka, Stefanie Kickinger, Zuzanna Rzepka, Paula Zaręba, Gniewomir Latacz, Agata Siwek, Małgorzata Wolak, Dorota Stary, Monika Marcinkowska, Petrine Wellendorph, Dorota Wrześniok, and Marek Bajda. Rational Search for Betaine/GABA Transporter 1 Inhibitors─In Vitro Evaluation of Selected Hit Compound ACS Chemical Neuroscience 2024 15 (21), 4046-4054. DOI: 10.1021/acschemneuro.4c00425.

133. Delia Belelli 1, Neil L Harrison 2, Jamie Maguire 3, Robert L Macdonald 4,5,6, Matthew C Walker 7, David W. Cope Extrasynaptic GABAA Receptors: Form, Pharmacology, and Function. J Neurosci. 2009 Oct 14;29(41):12757–12763. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009.

134. Song I, Volynski K, Brenner T, Ushkaryov Y, Walker M and Semyanov A (2013) Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources. Front. Cell. Neurosci. 7:23. doi: 10.3389/fncel.2013.00023.

135. Kickinger S, Lie MEK, Suemasa A, Al-Khawaja A, Fujiwara K, Watanabe M, Wilhelmsen KS, Falk-Petersen CB, Frølund B, Shuto S, Ecker GF and Wellendorph P (2021) Molecular Determinants and Pharmacological Analysis for a Class of Competitive Non-transported Bicyclic Inhibitors of the Betaine/GABA Transporter BGT1. Front. Chem. 9:736457. doi: 10.3389/fchem.2021.736457.

136. Yan X.X., Ribak C.E. Alteration of GABA transporter expression in the rat cerebral cortex following needle puncture and colchicine injection // Brain Res. – 1999. – Vol.23. – P.317-328.

137. Ryan RM, Ingram SL, Scimemi A. Regulation of Glutamate, GABA and Dopamine Transporter Uptake, Surface Mobility and Expression. Front Cell Neurosci. 2021 Apr 13;15:670346. doi: 10.3389/fncel.2021.670346.

138. Pazdernik TL, Layton M, Nelson SR, Samson FE. The osmotic/calcium stress theory of brain damage: are free radicals involved? Neurochem Res. 1992 Jan;17(1):11-21. doi: 10.1007/BF00966860. PMID: 1538823.

139. Giuliani, C.; Peri, A. Effects of Hyponatremia on the Brain. J. Clin. Med. 2014, 3, 1163-1177. https://doi.org/10.3390/jcm3041163.

140. Héja L, Kardos J. GABA fluctuations driven by astrocytic Glu/ GABA exchange explain synaptic acuity. Cell Signal. 2023;1(1):76-80.

141. Raiteri L. Interactions Involving Glycine and Other Amino Acid Neurotransmitters: Focus on Transporter-Mediated Regulation of

Release and Glycine-Glutamate Crosstalk. Biomedicines. 2024 Jul 8;12(7):1518. doi: 10.3390/biomedicines12071518.

142. Scimemi A (2014) Structure, function, and plasticity of GABA transporters. Front. Cell. Neurosci. 8:161. doi: 10.3389/fncel.2014.00161.

143. Passlick S, Rose CR, Petzold GC and Henneberger C (2021) Disruption of Glutamate Transport and Homeostasis by Acute Metabolic Stress. Front. Cell. Neurosci. 15:637784. doi: 10.3389/fncel.2021.637784.

144. Gadea, A. and López-Colomé, A.M. (2001), Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. J. Neurosci. Res., 63: 453-460. https://doi.org/10.1002/jnr.1039.

145. Jin X-T, Galvan A, Wichmann T and Smith Y (2011) Localization and Function of GABA Transporters GAT-1 and GAT-3 in the Basal Ganglia. Front. Syst. Neurosci. 5:63. doi: 10.3389/fnsys.2011.00063.

146. Y. Zhou, S. Holmseth, R. Hua, A. C. Lehre, A. M. Olofsson, I. Poblete-Naredo, S. A. Kempson, N. C. Danbolt. The betaine-GABA transporter (BGT1, slc6a12) is predominantly expressed in the liver and at lower levels in the kidneys and at the brain surface. American Journal of Physiology-Renal Physiology 2012 302:3, F316-F328 10.1152/ajprenal.00464.2011.

147. Wu, Y., W. Wang, A. Diez-Sampedro, G.B. Richerson. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. Neuron 56(5): 851-65, 2007.

148. Wu, Y., W. Wang, G.B. Richerson. Vigabatrin induces tonic inhibition via GABA transporter reversal without increasing vesicular GABA release. J Neurophysiol 89(4): 2021-2034, 2003.

149. Wu, Y., W. Wang, G.B. Richerson. GABA transaminase inhibition induces spontaneous and enhances depolarization-evoked GABA efflux via reversal of the GABA transporter. J Neurosci 21(8):2630-2639, 2001.

150. Gaspary, H., W. Wang, G.B. Richerson. Carrier-mediated GABA release induces GABA receptor conductances in hippocampal neurons. J Neurophysiol 80:270-281, 1998.

151. Lerma J. et al. In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on dialysis and computerized analysis // Brain Res. – 1986. – Vol.384. – P.145-155.

152. Lazzarin Erika, Gradisch Ralph, Skopec Sophie MC, Alves da Silva Leticia, Sebastianelli-Schoditsch Chiara, Szöllősi Dániel, Maier Julian, Sucic Sonja, Roblek Marko, Kanner Baruch I, Sitte Harald H, Stockner Thomas (2024) Interaction of GAT1 with sodium ions: from efficient recruitment to stabilisation of substrate and conformation. Structural Biology and Molecular Biophysics. eLife 13:RP93271. https://doi.org/10.7554/eLife.93271.3.

153. Chin-Chih Lu, Donald W. Hilgemann; Gat1 (Gaba:Na+:Cl−) Cotransport Function : Steady State Studies in Giant Xenopus Oocyte Membrane Patches . J Gen Physiol 1 September 1999; 114 (3): 429–444. doi: https://doi.org/10.1085/jgp.114.3.429.

154. Zerlotti R, Barthmes M, Bazzone A. Investigation of GABA transport and the GABA/Na+ relationship in human GAT1 using solid supported membrane-based electrophysiology. Biophysical Journal, 123176a.

155. Wu C, Sun D. GABA receptors in brain development, function, and injury. Metab Brain Dis. 2015 Apr;30(2):367-79. doi: 10.1007/s11011-014-9560-1.

156. Topchiy I, Mohbat J, Folorunso OO, Wang ZZ, Lazcano-Etchebarne C, Engin E. GABA system as the cause and effect in early development. Neurosci Biobehav Rev. 2024 Jun;161:105651. doi: 10.1016/j.neubiorev.2024.105651.

157. Frahm C, Draguhn A. GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. Brain Res Dev Brain Res. 2001 Dec 14;132(1):1-13. doi: 10.1016/s0165-3806(01)00288-7. PMID: 11744102.

158. Yehezkel Ben-Ari, Jean-Luc Gaiarsa, Roman Tyzio, Rustem Khazipov. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. Physiological Reviews 2007 87:4, 1215-1284 10.1152/physrev.00017.2006.

159. Cellot G., Cherubini E. (2013) Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. Front. Neural Circuits 7:136. doi: 10.3389/fncir.2013.00136.

160. Carrascosa-Romero, M. C., Vega, C. D. C. D. L. (2016). GABAergic Interneurons in Severe Early Epileptic Encephalopathy with a Suppression-Burst Pattern: A Continuum of Pathology. In Epileptology - The Modern State of Science. InTech. https://doi.org/10.5772/64458.

161. Fuhrer TE, Palpagama TH, Waldvogel HJ, Synek BJL, Turner C, Faull RL, Kwakowsky A. Impaired expression of GABA transporters in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus. Neuroscience. 2017 May 20;351:108-118. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.041.

162. Sutch RJ, Davies CC, Bowery NG. GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). Neurochem Int. 1999

May;34(5):415-25. doi: 10.1016/s0197-0186(99)00046-7. PMID: 10397370.

163. Liu Q. R. et al. Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain // J Biol Chem. – 1993. – Vol.268. – P.2106-2112.

164. Vitellaro-Zuccarello L, Calvaresi N, De Biasi S. Expression of GABA transporters, GAT-1 and GAT-3, in the cerebral cortex and thalamus of the rat during postnatal development. Cell Tissue Res. 2003 Sep;313(3):245-57. doi: 10.1007/s00441-003-0746-9.

165. Grote H, Amara S, Underhill S. Regulated Trafficking of GABA Transporters, GAT1 and GAT3, in Response to Methamphetamine Through the Trace Amine Associated Receptor, TAAR1. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2024, 389,118.

166. Yasir, M.; Choe, J.; Han, J.-H.; Chun, W. Molecular Basis of GABA Aminotransferase Inhibition in Epilepsy: Structure, Mechanisms, and Drug Development. Curr. Issues Mol. Biol. 2025, 47, 1032. https://doi.org/10.3390/cimb47121032.

167. Madia D, Sheikh M, Pethe A, Telange D, Agrawal S. Excitatory/Inhibitory balance in autism spectrum disorders: Integrating genetic, neurotransmitter and computational perspectives. AIMS Neurosci. 2025 Dec 11;12(4):635-675. doi: 10.3934/Neuroscience.2025031.

168. Ooi QY, Qin X, Yuan Y, Zhang X, Yao Y, Hao H, Li L. Alteration of Excitation/Inhibition Imbalance in the Hippocampus and Amygdala of Drug-Resistant Epilepsy Patients Treated with Acute Vagus Nerve Stimulation. Brain Sci. 2023 Jun 21;13(7):976. doi: 10.3390/brainsci13070976.

169. Žiburkus J, Cressman JR, Schiff SJ. Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory conductances during seizure-like events. J Neurophysiol. 2013 Mar;109(5):1296-306. doi: 10.1152/jn.00232.2012.

170. van van Hugte EJH, Schubert D, Nadif Kasri N. Excitatory/inhibitory balance in epilepsies and neurodevelopmental disorders: Depolarizing γ-aminobutyric acid as a common mechanism. Epilepsia. 2023;64:1975–1990. https://doi.org/10.1111/epi.17651.

171. Madsen KK, White HS, Schousboe A. Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. Pharmacol Ther. 2010 Mar;125(3):394-401. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.11.007.

172. White HS, Sarup A, Bolvig T, Kristensen AS, Petersen G, Nelson N, Pickering DS, Larsson OM, Frølund B, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A. Correlation between anticonvulsant activity and inhibitory action on glial gamma-aminobutyric acid uptake of the highly selective mouse gamma-aminobutyric acid transporter 1 inhibitor 3-hydroxy-4-amino-4,5,6,7-tetrahydro-1,2-benzisoxazole and its N-alkylated analogs. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Aug;302(2):636-44. doi: 10.1124/jpet.102.034819. PMID: 12130726.

173. Clausen RP, Moltzen EK, Perregaard J, Lenz SM, Sanchez C, Falch E, Frølund B, Bolvig T, Sarup A, Larsson OM, Schousboe A, Krogsgaard-Larsen P. Selective inhibitors of GABA uptake: synthesis and molecular pharmacology of 4-N-methylamino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]isoxazol-3-ol analogues. Bioorg Med Chem. 2005 Feb 1;13(3):895-908. doi: 10.1016/j.bmc.2004.10.029. PMID: 15653355.

174. Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ: Mechanisms of action of antiepileptic drugs. Curr Top Med Chem. 2005;5(1):3-14. doi: 10.2174/1568026053386962.

175. Julianna Kardos, Zsolt Szabó, László Héja. Framing Neuro-Glia Coupling in Antiepileptic Drug Design Miniperspective. Journal of Medicinal Chemistry 2016 59 (3), 777-787. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00331.

176. Jensen F. E., Applegate C. D., Holtzman D. et al. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain // Ann. Neurol. – 1991. – Vol.29. – P.629-637.

177. Whittaker V. P. Thirty years of synaptosome research // J Neurocytol. – 1993. – Vol.22. – P.735-742.

178. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // Methods Enzymol. – 1974. – Vol.31. – P.445–452.

179. Borisova T, Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, Borysov A, Griffin S, Wireman M. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport // Neurochem Int. – 2011. – Vol. 59. - P. 272-9.

180. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry metod for protein determination // Anal. Biochem. – 1986. – Vol.155. – P.243-248.

181. Pozdnyakova N., Yatsenko L., Parkhomenko N., Himmelreich N. Perinatal hypoxia induces long-lasting increase in unstimulated GABA release in rat brain cortex and hippocampus. The protective effect of pyruvate. Neurochem Int. 2011, V. 58, P. 14-21. doi:10.1016/j.neuint.2010.10.004.

182. Borisova T., Nazarova A., Dekaliuk M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Borysov A., Sivko R., Demchenko A. P. Neuromodulatory

properties of fluorescent carbon dots: effect on exocytotic release, uptake and ambient level of glutamate and GABA in brain nerve terminals. Int J Biochem Cell Biol. 2015, V. 59, P. 203-215.

183. Jensen F. E., Wang C. Hypoxia-induced hyperexcitability in vivo and in vitro in the immature hippocampus. Epilepsy Res. 1996, V.26, P. 131-140. doi:10.1016/S0920-1211(96)00049-6.

184. Sudhof T. C. The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci. 2004, V. 27, P. 509-547. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.

185. Cammack J. N., Rakhilin S. V., Schwartz E. A. A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry // Neuron. – 1994. – Vol.13. – P.949-960.

186. Kavanaugh M. P., Arriza J. L., North R. A. et al. Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in Xenopus oocytes // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol.267. – P.22007-22009.

187. Schousboe A. Pharmacological and functional characterization of astrocytic GABA transport: a short review // Neurochem. Res. – 2000. – Vol.25. – P.1241-1244.

188. Mathern G. W. et al. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy // Neurology. – 1999. – Vol.79. – P.453-472.

189. Pozdnyakova N., Yatsenko L., Parkhomenko N., Himmelreich N. Perinatal hypoxia induces long-lasting increase in unstimulated GABA release in rat brain cortex and hippocampus. The protective effect of pyruvate. Neurochem Int. 2011, V. 58, P. 14-21. doi:10.1016/j.neuint.2010.10.004.

190. Yatsenko L., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Himmelreich N. The dynamics of changes in hippocampal GABAergic system in rats

exposed to early-life hypoxia-induced seizures. Neurosci Lett. 2012, V. 524, P. 69-73.

191. Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. Nat Rev Neurosci. 2002, V. 3, P. 728-739. doi:10.1038/nrn920.

192. Sałat K., Więckowska A., Więckowski K., Höfner G. C., Kamiński J., Wanner K. T., Malawska B., Filipek B., Kuliget K. Synthesis and pharmacological properties of new GABA uptake inhibitors. Pharmacol Rep. 2012, 64(4), 817-833. doi:10.1016/S1734-1140(12)70877-0.

193. Melone M., Cozzi A., Pellegrini-Giampietro D. E., Conti F. Transient focal ischemia triggers neuronal expression of GAT-3 in the rat perilesional cortex. Neurobiol Dis. 2003, V. 14, P. 120-132. doi:10.1016/S0969-9961(03)00042-1.

194. Dalby N. O. Inhibition of γ-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. Europ. J. Pharmacol. 2003, V. 479, P. 127-137. doi:10.1016/j.ejphar.2003.08.063.

195. Hu J., Quick M. W. Substrate-mediated regulation of gammaaminobutyric acid transporter1 in rat brain. Neuropharmacology. 2008, V. 54, P. 309-318. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.09.013.

196. Kirmse K., Kirischuk S., Grantyn R. Role of GABA transporter 3 in GABAergic synaptic transmission at striatal output neurons. Synapse. 2009, V. 63, P. 921-929. doi:10.1002/syn.20675.

197. Tiedje K. E., Stevens K., Barnes S., Weaver D. F. β-Alanine as a small molecule neurotransmitter. Neurochem Int. 2010, V. 57, P. 177-188. doi:10.1016/j.neuint.2010.06.001.

198. Tan C. Y. K., Wainman D., Weaver D. N-, α-, and β- substituted 3-aminopropionic acids: design, syntheses and antiseizure activities. Bioorg. Med. Chem. 2003, V. 11, P. 113–121. doi:10.1016/S0968-0896(02)00330-9.

199. Harris R. C , Tallon M. J., Dunnett M., Boobis L., Coakley J., Kim H. J., Fallowfield J. L., Hill C. A., Sale C., Wise J. A. The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. Amino Acids. 2006, 30(3), 279-289. doi:10.1007/s00726-006-0299-9.

200. MacPhee S., Weaver I. N., Weaver D. F. An evaluation of interindividual responses to the orally administered neurotransmitter β-alanine. J Amino Acids. 2013, 2013(429847), 5 p. doi:10.1155/2013/429847.

201. Mathers D. A., McCarthy S. M., Cooke J. E,. Ghavanini A. A, Puil E. Effects of the beta-amino acid antagonist TAG on thalamocortical inhibition. Neuropharmacology. 2009. V. 56. P. 1097-1105. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.03.008.

202. Gemelli T., de Andrade R. B., Rojas D. B., Bonorino N. F., Mazzola P. N., Tortorelli L. S., Funchal C., Filho C. S. D., Wannmacher C. M. D. Effects of β-alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryltransfer network in cortex and cerebellum of rats. Mol Cell Biochem. 2013, 380(1-2), 161-170. doi:10.1007/s11010-013-1669-8.

203. Borisova, T., 2014. The neurotoxic effects of heavy metals: alterations in acidification of synaptic vesicles and glutamate transport in brain nerve terminals. Horizons Neurosci Res 14, 89–112.

204. Borisova, T., Sivko, R., Borysov, A., Krisanova, N., 2010b. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-β-cyclodextrin-

mediated changes in glutamate transport. Cell. Mol. Neurobiol. 30, 1013–23. doi:10.1007/s10571-010-9532-x

205. Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre, A., 1999. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. J. Neurochem. 72, 625–33.

206. Talos, D.M., Chang, M., Kosaras, B., Fitzgerald, E., Murphy, A., Folkerth, R.D., Jensen, F.E., 2013. Antiepileptic effects of levetiracetam in a rodent neonatal seizure model. Pediatr. Res. 73, 24–30. doi:10.1038/pr.2012.151

207. Bajjalieh, S.M., Frantz, G.D., Weimann, J.M., McConnell, S.K., Scheller, R.H., 1994. Differential expression of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms. J. Neurosci. 14, 5223–35.

208. Sandra M. Bajjalieh, Karen Peterson, Michal Inial, Richard H. Scheller Brain contains two forms of synaptic vesicle protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 90, pp. 2150-2154.

209. Patsalos, P.N., 2000. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. Pharmacol. Ther. 85, 77–85.

210. Rigo, J.-M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Leprince, P., Moonen, G., Selak, I., Matagne, A., Klitgaard, H., 2002. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. Br. J. Pharmacol. 136, 659–672. doi:10.1038/sj.bjp.0704766

211. Rambeck, B., Jurgens, U.H., May, T.W., Wolfgang Pannek, H., Behne, F., Ebner, A., Gorji, A., Straub, H., Speckmann, E.-J., Pohlmann-Eden, B., Loscher, W., 2006. Comparison of Brain Extracellular Fluid, Brain Tissue, Cerebrospinal Fluid, and Serum Concentrations of Antiepileptic Drugs Measured Intraoperatively

in Patients with Intractable Epilepsy. Epilepsia 47, 681–694. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00504.x.

212. Hensler JG, Advani T, Burke TF, Cheng K, Rice KC, Koek W (2012) GABAB Receptor-positive modulators: brain region-dependent effects. J Pharmacol Exp Ther 340(1):19–26.
213. Koek W, France CP, Cheng K, Rice KC (2012) Effects of the GABAB receptor-positive modulators CGP7930 and rac-BHFF in baclofen- and c-hydroxybutyrate-discriminating pigeons. J Pharmacol Exp Ther 341(2):369–376.
214. Koek, W. · Cheng, K. · Rice, K.C. Discriminative stimulus effects of the GABAB receptor-positive modulator rac-BHFF: comparison with GABAB receptor agonists and drugs of abuse. J Pharmacol Exp Ther. 2013; 344(3):553-560.
215. Malherbe P, Masciadri R, Norcross RD, Knoflach F, Kratzeisen C, Zenner MT, Kolb Y, Marcuz A, Huwyler J, Nakagawa T, Porter RH, Thomas AW, Wettstein JG, Sleight AJ, Spooren W, Prinssen EP (2008) Characterization of (R, S)-5,7-di-tert-butyl-3-hydroxy-3-trifluoromethyl-3H-benzofuran-2-one as a positive allosteric modulator of GABAB receptors. Br J Pharmacol 154:797–811.
216. Begue J-P, Bonnet-Delpon D. Bioorganic and medicinal chemistry of fluorine // Wiley, 2008. – 365 p. ch4.
217. Kirk K.L. Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules // J Fluor Chem 2006. – Vol. -127. - P. 1013–29._DOI: 10.1016/j.jfluchem.2006.06.007.
218. Filler R, Kobayashi Y, Yagupolskii LM. Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biochemical Applications // Elsevier: Amsterdam, -1993.
219. K.O. Paliienko, T.O. Veklich, O.Ya. Shatursky, O.A. Shkrabak, A.O. Pastukhov, M.O. Galkin, N.V. Krisanova, A.Ju. Chunikhin, A.V.

Rebriev, A.V. Lysytsya, T.A. Borisova, S.O. Kosterin. Membrane action of polyhexamethylene guanidine hydrochloride revealed on smooth muscle cells, nerve tissue and rat blood platelets: a biocide driven pore-formation in phospholipid bilayers // Toxicol. in Vitro – 2019. -V. 60, P. 389–399.

220. Borisova T., Borysov A. Putative duality of presynaptic events. Rev Neurosci. 2016, 27 (4), 377–83. https://doi.org/10.1515/rev-neuro-2015-0044.

221. Borisova T., Borysov A., Pastukhov A., Krisanova N. Dynamic Gradient of Glutamate Across the Membrane: Glutamate/Aspartate-Induced Changes in the Ambient Level of L-[(14)C]glutamate and D-[(3)H]aspartate in Rat Brain Nerve Terminals. Cell Mol Neurobiol. 2016, 36 (8), 1229–1240. https://doi.org/10.1007/s10571-015-0321-4.

222. Bramini M., Sacchetti S., Armirotti A., Rocchi A., Vázquez E., León Castellanos V., Ban diera T., Cesca F., Benfenati F. Graphene Oxide Nanosheets Disrupt Lipid Composition, Ca^{2+} Homeostasis, and Synaptic Transmission in Primary Cortical Neurons. ACS Nano. 2016, 10 (7), 7154–7171. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b03438.

ДОДАТОК 1

1. Yatsenko L., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Himmelreich N. The dynamics of changes in hippocampal GABAergic system in rats exposed to early-life hypoxia-induced seizures. **Neurosci Lett. 2012,** Aug 30;524(2):69-73. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.015. **(Q2)**

   Яценко Л. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Гіммельрейх Н. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

2. 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,** Jun 1;55(3):250-8. doi: 10.3325/cmj.2014.55.250. (**Q2)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Яценко Л. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Гіммельрейх Н. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

   Крупко О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

3. **Дударенко М.В.**, Яценко Л.М., Піскова М.В. Вплив NO-711 і бета-аланіну на накопичення глутамату та γ-аміномасляної кислоти нервовими терміналями головного мозку щурів після перинатальної гіпоксії. **Biotechnologia Acta. 2015,** Vol.8, N3., С.67-77.

   Дударенко М.В. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Яценко Л.М. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

   Піскова М.В. – супровід експериментальної роботи.

4. Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Borisova T. New effects of GABAB receptor allosteric modulator rac-BHFF on ambient GABA, uptake/release, Em and synaptic vesicle acidification in nerve terminals. **Neuroscience. 2015**, Vol.304., P.60-70. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.037. (**Q4)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування,;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

5. Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Borisova T. Age-dependency of Levetiracetam effects on exocytotic GABA release from nerve terminals in the hippocampus and cortex in norm and after perinatal hypoxia. **Cell Mol Neurobiol. 2019,** Jul;39(5):701-714. doi: 10.1007/s10571-019-00676-6. (**Q2)**

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування,;

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

6. **Dudarenko M.V.**, Pozdnyakova N.G. Perinatal hypoxia and thalamus brain region: Increased efficiency of antiepileptic drug levetiracetam to inhibit GABA release from nerve terminals. **Ukr.Biochem.J. 2022**; Vol.94, Iss.5, Sep-Oct, P.28-39.

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

7. **Dudarenko, M.**, Krisanova, N., Pozdnyakova , N., Pastukhov, A., Pariiska, O., Kurys, Y., Sotnik S., Kolotilov S. V., Koshechko V., Borisova T. Assessment of acute neurotoxicity of nitrogen-doped multilayer graphene nanoparticles and their capability to change Cd^{2+}/Pb^{2+}/Hg^{2+}-induced injury in brain cortex nerve terminals. **Biotechnologia Acta. 2023,** 16(5), 45-54.

   Дударенко М. – супровід експериментальної роботи;

   Крисанова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Позднякова Н. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

   Пастухов А. – супровід експериментальної роботи;

   Парійська О. – синтез і характеризація графенових наночастинок;

   Курис Є. – синтез і характеризація графенових наночастинок;

   Сотнік С. – аналіз та візуалізація даних;

   Колотілов С. – аналіз та візуалізація даних;

   Кошечко В. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Борисова Т. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

8. Shatursky O.Y., Krisanova N.V., Pozdnyakova N., Pastukhov A.O., **Dudarenko M.**, Kalynovska L., Shkrabak A.A., Veklich T.O., Selikhova A.I., Cherenok S.O., Borisova T.A., Kalchenko V.I., Kosterin S.O. Substitution of bridge carbons for sulphur in calix[4]arene-bis-α-hydroxymethylphosphonic acid transformed mobile carrier into ionic channel accompanied with evoked muscle contraction and impaired neurotransmission powered by membrane action of resulting thiocalix[4]arene-bis-α-hydroxymethylphosphonic acid. **Toxicol In Vitro**. **2024,** Jun;98:105815. doi: 10.1016/j.tiv.2024.105815. (**Q2)**

Шатурський О.Я. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Крисанова Н.В. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Позднякова Н.Г. – ідея досліджень, супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Пастухов А.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Дударенко М.В. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Калиновська Л.М. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Шкрабак О.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування;

Векліч Т.О. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних, написання статті, редагування;

Селіхова А.І. – супровід експериментальної роботи, аналіз та візуалізація даних;

Черенок С. О. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Борисова Т.О. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Кальченко В.І. – ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків;

Костерін С.О.– ідея досліджень, написання статті, редагування, загальне керівництво роботою, формування висновків.

9. Yatsenko L.N., Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Parkhomenko N.T., Himmelreich N.H. Activity of GABA transporters in the cortex, hippocampus and thalamus of the developing rat brain. Effect of perinatal hypoxia. Abstracts of Eighth International Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology", Sudak, Crimea, Ukraine, 2-12 june, **2012**, P.466.
10. Yatsenko L.N., Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Himmelreich N.H. Levetiracetam increases GABA release from cortical, hippocampal and thalamic synaptosomes of rats exposed to perinatal hypoxia. Abstracts of Ninth International Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology", Sudak, Crimea, Ukraine, 3-13 june **2013**, P.385.
11. Krupko O., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Krisanova N., Borisova T. High-affinity sodium-dependent uptake and exocytotic release of [^{3}H]GABA from nerve terminals under centrifuge-induced hypergravity. 15-а Українська конференція з космічних досліджень. 24-28 серпня 2015 р., Одеса, Україна : Тези доповідей конференції. **2015**, С.45.
12. Borisova T.A., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N. $GABA_B$ receptor positive allosteric modulator rac-BHFF: Influence of onthe extracellular level, uptake/release of [^{3}H]GABA, Em and synapticvesicle acidification in cortical and hyppocampal presynaptic nerveterminals. RECOOP HST

"Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference", April 16-19, 2015, Wrosclaw, Poland. **2015**, P.48.

13. Borisova T., Dekaliuk M., Pozdnyakova N., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Nazarova A., Borysov A., Demchenko A.P. Fluorescent and neuroactive properties of carbon dots synthesized from sulphur-containing carbohydrate precursor. Abstracts of RECOOP HST association 6th TriNet Meeting Prague, October, 15-18, **2015**, P.34.
14. Borysov A., Pozdnyakova N., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Nazarova A., Borisova T. Neurotoxic properties of carbon dots synthesized from sulphur-containing carbohydrate precursor. Abstracts of RECOOP HST association, Bridges in life sciences 11th annual scientific conference, April, 7-10, **2016**, Prague, Czech Republic, Abstract Book, P.39.
15. **Дударенко М.В.**, Позднякова Н.Г. Вплив нових фторвмісних аналогів ГАМК на накопичення [^{3}H]ГАМК нервовивими терміналями головного мозку щурів. Тези Наукової Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 26-27 травня **2016** р., С.18.
16. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Pastukhov A., Borisova T. The effects of an allosteric modulator of the $GABA_B$ receptor, rac-BHFF, on Em, synaptic vesicle acidification, and transport of GABA and glutamate in nerve terminals. Acta Biochimica Polonica (Supplement 1, 2016) Abstracts of X PARNAS CONFERENCE YOUNG SCIENTIST FORUM "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine", July, 10-12, **2016**, Wrocław, Poland, P.22.
17. **Dudarenko M.**, Galkin M.O., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Krupko O., Nazarova A., Borysov A., Krisanova N., Borisova T. Combined effects of nanodiamonds and inorganic Martian dust simulant on glutamaergic neurotransmission. 16-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень **2016**, Збірник тез, С.48.

18. Krupko O., Krisanova N., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Borisova T. The influence of altered gravity conditions on the protonophore-evoked glutamate release. 16-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень **2016**, Збірник тез, С.50.
19. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Kaminskyy D., Kryshchyshyn A., Lesyk R., Borysova T. 4-Thiazolidinone derivatives change the membrane potential of rat brain nerve terminals. RECOOP HST Association, Bridges in life sciences 13th Annual Scientific Conference, April 11-15, **2018**, Zagreb, Croatia, P.38.
20. Borysov A., Galkin M., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Krisanova N., Borisova T. Neurotoxic level of synthesized, native and physiological nanoparticles: a comparative analysis. RECOOP HST Association, Bridges in life sciences 13th Annual Scientific Conference, April 11-15, **2018**, Zagreb, Croatia, P.43.
21. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N., Kaminskyy D., Kryshchyshyn A., Lesyk R., Borysova T. Novel 4-Thiazolidinone derivatives change the acidification ofsynaptic vesicles in rat brain nerve terminals. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine: Ukr. Biochem. J., **2018**, V.90, Special Issue, P.40.
22. **Dudarenko M.V.**, Krisanova N.V., Pastukhov A.O., Pozdnyakova N.G., Borisova T.O. Inorganic analogue of martian dust enriched with novel carbon nanoparticles: neurotoxicity assessment in vitro using brain nerve terminals. 18th Ukrainian Conference on Space Research, September 17-20, **2018**, Kyiv, Ukraine, P.61.
23. Pastukhov A., Borysov A., Galkin M., Paliienko K., Pozdnyakova N., KrisanovaN., **Dudarenko M.**, Babic M., Horak D., Lesiak A., Podhorodecki A., Borisova T. Modulation of neuroactive properties of nanoparticles by protein biocorona. RECOOP HST Association, RECOOP 9th Annual

Project Review Meeting, October 11-14, **2018**, Bratislava, Slovak Republic, P.29.

24. **Dudarenko M.**, Pozdnyakova N. Levetiracetam effects on exocytotic GABA release from thalamic nerve terminals in norm and after perinatal hypoxia. RECOOP HST Association, RECOOP 10th Annual Project Review Meeting, October 11-12, 2019, Wroclaw, Poland. – **2019**, P. 75.
25. Pozdnyakova N.G., **Dudarenko M.V.**, Grytsaenko V.V., Pastukhov A.O., Krisanova N.V., Kaminskyy D.V., Kryshchyshyn A.P., Lesyk R.B., Borysova T.A. Novel neuroactive 4-thiazolidinone derivative, Les-2769: Effects on the ambient level and uptake of GABA and glutamate in presynaptic nerve terminals. RECOOP 15th Bridges in Life Sciences and 3rd International Student Video Conferences online on October 1-2, **2020**, Abstract book, P .56.
26. Kalynovska L., Paliienko K., Korbush M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Borysov A., Tarasenko A., Pastukhov A., **Dudarenko M.**, Garmanchuk L., Dovbynchuk T., Tolstanova G., Borisova T. Effect of smoke aerosol particulate matter from peat on gut and brain cell functioning. 4 th International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences. April 7 - 8, **2022,** Prague, Czech Republic, Abstract book, P.134.
27. Pastukhov A., Pozdnyakova N., Krisanova N., **Dudarenko, M.**, Paliienko K., Tarasenko A., Kalynovska L., Borisova T. A comparative study of neuroactive properties of particulate matter from plastic/wood smoke aerosols and gasoline engine exhaust. FEBS congress, FEBS Open Bio. **2023,** - 13 (Suppl. S2), P.61–258. doi: 10.1002/2211-5463.13646.
28. **Dudarenko M.V.**, Paliienko K.O., Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Borysov A.A., Pastukhov A.O., Kalynovska L.M., Borisova T.O. Different neuroactive properties of smoke particulate matter from plastic and wood combustion and gasoline engine exhaust. 5th

RECOOP International Student and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences. April 20-21, **2023,** Budapest, Hungary, Abstract book, P.129.

29. **Dudarenko M.**, Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Panas I., Borisova T. Modulatory effect of carbon dots on mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals. 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11-12, **2024**, Bratislava, Slovakia, Abstract book, P.78.
30. Krisanova N., Pozdnyakova N., **Dudarenko M.**, Pastukhov A., Sivko R., Driuk M., Kalynovska L., Dovbeshko G., Borisova T. Neuroactive properties of war-derived air pollution nanohybrids. 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11-12, **2024**, Bratislava, Slovakia, Abstract book, P.63.
31. **Dudarenko M.V.**, Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Pastukhov A.O., Driuk M.M., Panas I.D., Borisova T.O. Spontaneous ROS generation in the presynaptic brain nerve terminals during combined application of cadmium and smoke PM preparations. 20th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, April 2-3, **2025**, Prague, Czech Republic, Abstract book, P.13.

Патенти України

1. Патент України №114258. Заявка на корисну модель № u 2016 06906, МПК (2016.01) A61K 31/02, A61K 31/325, A61K 49/00, G01N 33/483. Фторовмісний аналог γ-аміномасляної кислоти із замісником β-CF_2CF_2H, що викликає збільшення початкової швидкості накопичення та зниження стимульованого деполяризацією плазматичної мембрани вивільнення γ-аміномасляної кислоти нервовими терміналями головного мозку щурів / Борисова Т.О., Позднякова Н.Г., Дударенко М.В., Кухар В.П., Герус І.І., Шайтанова О.М., Заявники та патентовласники Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України – заявл. 24.06.2016.