



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93636** (13) **U**  
(51) МПК (2014.01)  
**C07D 277/00**

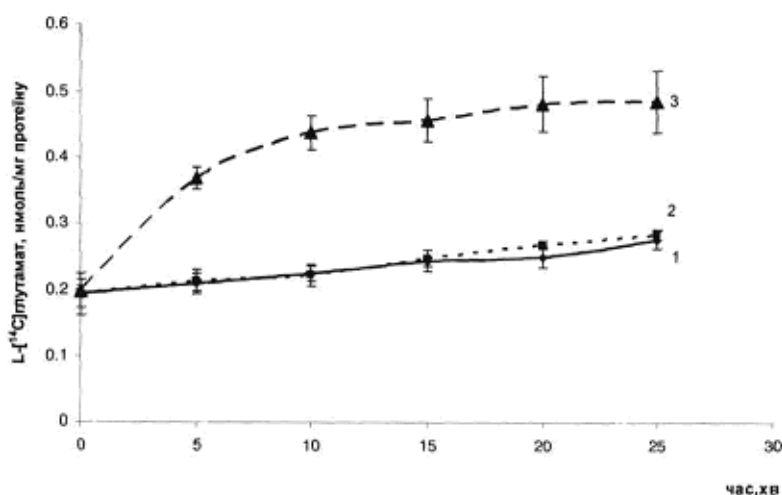
## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2014 04638</b>	(72) Винахідник(и): <b>Борисова Тетяна Олександрівна (UA), Романенко Олександр Вікторович (UA), Крисанова Наталія Валеріївна (UA), Борисов Арсеній Андрійович (UA), Остапченко Людмила Іванівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>30.04.2014</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.10.2014</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.10.2014, Бюл.№ 19</b>	(73) Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA), ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)</b>

## (54) БІЛКОВИЙ КОМПЛЕКС ФЕРИТИН

### (57) Реферат:

Білковий комплекс феритин, до складу якого входять феригідритні наночастинки, що збільшує позаклітинний рівень глутамату в нервових терміналах головного мозку



Фіг. 1

UA 93636 U



Корисна модель належить до галузі біотехнології та медицини.

Задачею корисної моделі є дослідження дії білкового комплексу феритину, до складу якого входять магнітні феригідритні наночастинки, на позаклітинний рівень глутамату та мембранний потенціал нервових терміналей головного мозку.

5 Вивчення дії феритину на позаклітинний рівень глутамату та мембранний потенціал нервових терміналей головного мозку проводилось у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України і на кафедрі біології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

10 Феритин складається з 24 субодиниць, які формують сферичну оболонку з великою порожниною, де розміщуються іони тривалентного заліза у формі компактних мінеральних кристалітів, що нагадують феригідрити. Феритинове ядро, діаметр якого змінюється в різних тканинах від 3,5 нм до 7,5 нм, виявляє суперпарамагнітні властивості, які характерні для магнітних наночастинок. Феритин забезпечує динамічний баланс заліза, захищаючи клітину від потенційного залізо-опосередкованого ушкодження вільними радикалами та вивільнюючи іони металу за потреби. В середині клітини феритин було знайдено в цитозолі, ядрах, ендолізосомальних компартментах та мітохондріях. Позаклітинний феритин знайдено в сироватці крові, синовіальній та цереброспінальній рідині. Внутрішньоклітинний та позаклітинний феритин може відігравати роль у між- та внутрішньоклітинному перерозподілі заліза. Нещодавно було висунуто гіпотезу, що однією з причин розвитку нейрологічних захворювань може бути порушення транспорту заліза у мозку [1]. Нині існує припущення що феритин може відігравати суттєву провокуючу роль у розвитку нейродегенерації [1]. Механізм, за допомогою якого феритин переміщується через гематоенцефалічний бар'єр є катрин-залежним, схожий на раніше виявлений для трансферину. Зв'язування екзогенного феритину з рецепторами клітинної поверхні розглядається як важливий шлях надходження заліза в мозок [2-4]. Порушення надходження заліза в мозок або регуляції цього процесу може спричинювати аномальний перерозподіл заліза, що сприяє розвитку цілої низки нейрологічних порушень.

Передбачається використання феритину як моделі та прототипу синтезованих магнітних наночастинок, покритих полімерами [5].

30 Амінокислота глутамат в центральній нервовій системі ссавців є найбільш розповсюдженим збуджуючим медіатором і приймає участь в здійсненні багатьох функцій головного мозку, включаючи розпізнавання, пам'ять, навчання тощо. Найхарактернішою рисою патогенезу більшості неврологічних розладів та захворювань (хвороба Альцгеймера, епілепсія, шизофренія та інші) є порушення транспорту глутамату [6]. У нервовій системі надлишковий позаклітинний глутамат має токсичні властивості, оскільки надмірна активація глутаматних рецепторів та масивний вхід кальцію може призвести до загибелі нейронів. Підтримання низького рівня позаклітинного глутамату є дуже важливим для певної спонтанної активності мозку та нормальної синаптичної передачі, причому навіть незначні зміни рівня позаклітинного глутамату здатні призводити до суттєвих порушень у функціонуванні центральної нервової системи. Термінація глутаматергічної нейропередачі відбувається шляхом видалення нейромедіатора з синаптичної щілини за рахунок його поглинання всередину нервової клітини. Поглинання глутамату нервовими клітинами забезпечується роботою високоафінних натрій-залежних глутаматних транспортерів, які локалізовані у плазматичній мембрані нейронів і гліальних клітин [6]. Рушійною силою для функціонування цих транспортерів є  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  градієнт плазматичної мембрани. Вивільнений в синаптичну щілину шляхом екзоцитозу глутамат зв'язується з мембранними рецепторами та активує відповідні сигнальні шляхи, що забезпечує подальшу передачу сигналу. За відсутності стимуляції нервових закінчень концентрація позаклітинного глутамату є однією з основних характеристик, що визначає спонтанну активність мозку. Рівень глутамату у синаптичній щілині встановлюється балансом між накопиченням глутамату та його вивільненням. За нормальних умов концентрація глутамату в синаптичній щілині підтримується на достатньо низькому рівні, що становить менше ніж 1 мкМ. Завдяки цьому унеможливується надмірна активація іонотропних та метаботропних глутаматних пост- та пресинаптичних рецепторів. В той же час надзвичайно важливим для нормального функціонування мозку є процес тонічної активації цих рецепторів позаклітинним глутаматом. Підвищена концентрація глутамату у синаптичній щілині порушує синаптичну передачу та створює підґрунтя для розвитку нейрологічних розладів.

55 Ізольовані нервові термінали (синаптосоми), виділені з головного мозку щурів, зберігають усі властивості інтактного нервового закінчення, що забезпечують процес передачі нервового імпульсу, а саме, здатність накопичувати та вивільнювати нейромедіатори, підтримувати мембранний потенціал та функціональний стан синаптичних везикул. Беручи до уваги наведені вище дані, є доцільним проаналізувати вплив феритину на позаклітинний рівень глутамату та

потенціал плазматичної мембрани в нервових закінченнях головного мозку щурів, що матиме значення для використання феритину у галузі біотехнології та медицині для модуляції транспорту нейромедіаторів у нервових терміналах головного мозку.

В основу корисної моделі поставлено задачу того, що феритин викликає збільшення позаклітинного рівню радіоактивно міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату в попередньо навантажених ним препаратах ізольованих нервових терміналей (синапсом) головного мозку щурів. Позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C] глутамату в синапсосомах збільшувався в присутності феритину у концентрації 80 мкг/мл у середовищі інкубації приблизно у два рази у порівнянні з контролем. Позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату становив за відсутності феритину - 0,200±0,015 нмоль/мг білка, в присутності феритину в середовищі інкубації синапсом упродовж 5 хв. в концентрації 80 мкг/мл - 0,368±0,016 нмоль/мг білка. Позаклітинний рівень глутамату залишається суттєво підвищеним протягом 25 хв. Показано також, що феритин не викликає зміни мембранного потенціалу синапсом. Ці факти є важливими для використання феритину у галузі біотехнології для модуляції транспорту глутамату у нервових терміналах головного мозку.

Ознаки способу.

Методика виділення нервових закінчень (синапсом) з головного мозку щурів та визначення позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C]глутамату в синапсосомах

Виділення синапсом з головного мозку щурів

Щурів-самців лінії Wistar масою 100-120 г декапітували, великі півкулі головного мозку швидко переносили в розчин, що містив 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) та 0,2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА). Усі операції проводилися при 4 °С. Синапсоми виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням в градієнті щільності фіколу, застосовуючи метод Котмана [7] у такій модифікації: розчин сахарози для приготування градієнту фіколу містив 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) і 0,2 мМ ЕДТА. Синапсомальну фракцію, отриману при центрифугуванні гомогенату головного мозку в градієнті щільності фіколу, розводили 10 об'ємами 0,32 М сахарози, 5 мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) і 0,2 мМ ЕДТА та центрифугували при 20000 g упродовж 20 хв. Отриманий осад повільно суспендували в 4 мл оксигенованого холодного середовища, що містило (в мМ): NaCl-126, KCl-5, MgCl<sub>2</sub>-1,4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1,0, HEPES-20, CaCl<sub>2</sub>-2, d-глюкозу - 10 (pH 7,4). При цьому кінцева концентрація білка становила 4 мг/мл. Синапсоми використовували в експериментах упродовж 2-4 годин після отримання. Концентрацію білка визначали за методом Ларсона [8]. Визначення позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C] глутамату в синапсосомах

Суспензія синапсом розводилася стандартним сольовим розчином так, що містила 1 мг білка/мл, і після 10 хв. преінкубації при 37 °С навантажувалася L-[<sup>14</sup>C]глутаматом (500 нМ, 238 мCi/ммол) (Amersham, Великобританія) в кальцієвому стандартному сольовому розчині упродовж 10 хв. Після цього суспензія синапсом відмивалася 10 об'ємами льодяного стандартного

сольового розчину і розводилася до концентрації 1 мг білка/мл і відразу використовувалася для визначення вивільнення L-[<sup>14</sup>C] глутамату з синапсомом.

Аліквоти (120 мкл синапсомом, навантажених L-[<sup>14</sup>C]глу там атом, 25-30 мкг білка), преінкубували 10 хв при 37 °С. Вимірювання позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C] глутамату в синапсосомах у кальційвмісному середовищі відбувалося 1-25 хв. Через визначений проміжок часу суспензію синапсом швидко осаджували в мікроцентрифузі, 10000 g протягом 20 с. Аліквоти надосаду (90 мкл) та солюбілізованого додецилсульфатом натрію осаду (90 мкл) змішували з синтіляційною рідиною ACS (Amersham, Великобританія) (1,5 мл) та визначали радіоактивність за допомогою синтіляційного лічильника Tracor Analytic Delta 300 (США). Загальний вміст радіоактивності визначали як суму радіоактивності у аліквоті надосаду та у аліквоті солюбілізованого осаду.

Згідно з протоколом дослідження позаклітинного рівня глутамату в ізольованих нервових закінченнях головного мозку щурів вивчалася з використанням радіоактивно міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату, яким попередньо були навантажені синапсоми (див. методику). В наших експериментах спостерігається постійне нестимульоване (базальне) вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату, що є однією з основних характеристик препарату синапсомом (Фіг. 1, суцільна лінія). На теперішній час механізм, завдяки якому L-[<sup>14</sup>C]глутамат спонтанно вивільнюється з нервових закінчень у синаптичну щілину, остаточно не з'ясовано, але передбачається можливість залучення до цього процесу спонтанного екзоцитозу, аніонних каналів, цистеїн - глутаматного обмінника та трансмембранної дифузії. Було продемонстровано, що додавання феритину до нервових закінчень призводило до збільшення позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C]глутамату у синапсосомах. На Фіг. 1 (пунктирна лінія 3) представлено динаміку зміни позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C]глутамату внаслідок його нестимульованого вивільнення з

синапсом у часі за умови їх інкубації з феритином в концентрації 80 мкг/мл. Показано, що феритин суттєво підвищує позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату в ізольованих нервових закінченнях упродовж 1-25 хв. (n=5; P≤0,05). Додаткові контрольні експерименти проводились у присутності альбуміну (80 мкг / мл) Фіг.1 (пунктирна лінія 2).

5 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> електрохімічний градієнт на плазматичній мембрані є рушійною силою для транспортер-залежного накопичення глутамату, зміни мембранного потенціалу можуть впливати на початкову швидкість цього процесу [9-11]. Як з'ясувалося, деполяризація плазмалемми 35 мМ KCl призводила до зниження початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату удвічі. Вимірювання потенціалу плазматичної мембрани E<sub>m</sub> проводили з використанням катіонного потенціал-чутливого флуоресцентного барвника родаміну 6G (Molecular Probes, США). Показано, що додавання феритину до синапсом не призводить до збільшення флуоресцентного сигналу зонду, що свідчить про відсутність деполяризації плазматичної мембрани нервових закінчень (Фіг.2). Таким чином, слід підкреслити наступне:

1. Феритин збільшує позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату в ізольованих нервових закінченнях (синапсомах) головного мозку щурів.

2. Внесення феритину у концентрації 80 мкг/мл у середовище інкубації синапсом обумовлює збільшення позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C]глутамату на 85 %.

3. Додавання феритину у концентрації 80 мкг/мл до синапсом не призводить до сигналу потенціал-чутливого флуоресцентно флуоресцентного барвника родаміну 6G, що свідчить про відсутність деполяризації плазматичної мембрани нервових закінчень.

Джерела інформації::

1. Friedman A., P. Arosio, D. Finazzi, D. Koziorowski, J. Galazka-Friedman, Ferritin as an important player in neurodegeneration, Parkinsonism and Related Disorders 2011 17 423-430.

2. Kidane T.Z., E. Sauble, M.C. Linder, Release of iron from ferritin requires lysosomal activity, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2006, V. 291. - C445-C455.

3. Kalgaonkar S., B. Lonnerdal Receptor-mediated uptake of ferritin-bound iron by human intestinal Caco-2 cells, J. Nutr. Biochem. 2009, V. 20-304-311.

4. Burdo J.R., D.A. Antonetti, E.B. Wolpert, J.R. Connor, Mechanisms and regulation of transferrin and iron transport in a model blood-brain barrier system, Neuroscience 2003, V. 121-883-890.

5. Alekseenko A.V., Waseem T.V., Fedorovich S.V. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes // Brain Res. - 2008. - V. 1241. - P. 193-200.

6. Danbolt N. Glutamate uptake // Prog. Neurobiol. - 2001. - V. 65. - P. 1-105.

7. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // Meth. Enzymol.-1974.- V. 31. - P. 445-452.

8. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // Anal. Biochem. - 1986. -Vol.155, № 2. - P. 243-248.

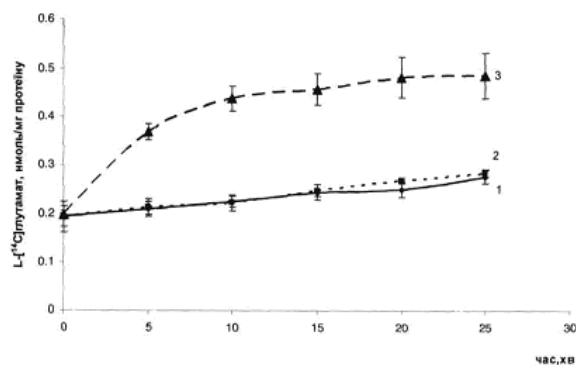
9. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-beta-cyclodextrin-mediated changes in glutamate transport // Cell. Moï. Neurobiol. - 2010. - V. 30, № 7. - P. 1013-1023.

10. 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. - 2010. - V. 56. - P. 466-478.

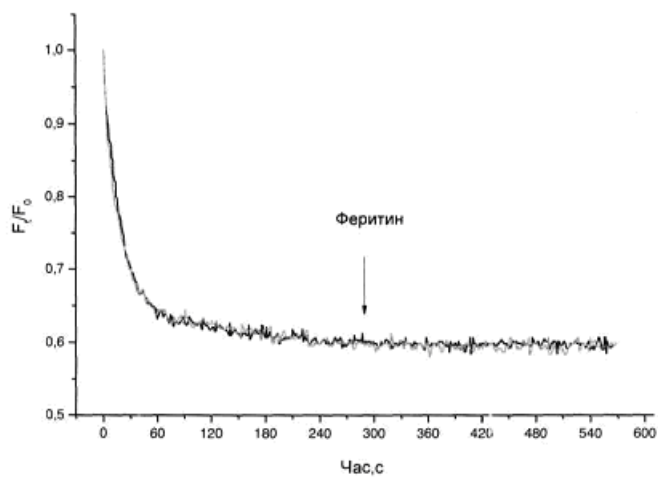
11. Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, Borisova T. Neuroprotection by lowering cholesterol: a decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals // Biochim Biophys Acta. - 2012. - V. 1822. - P. 1553-1561.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Білковий комплекс феритин, до складу якого входять феригідритні наночастинки, що збільшує позаклітинний рівень глутамату в нервових терміналах головного мозку.



Фіг. 1



Фіг. 2

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601