

УДК 523.3-36:523.43-36:577.112.384.4:577.175.82:612.815.1

№ держреєстрації

Інв. № 19/18

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

01601, м.Київ, вул. Леонтовича 9,

Тел. 2343254

Факс 2796365

secretar@biochem.kiev.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту
академік НАН України
С.В. КОМІСАРЕНКО

«__» _____ 2018 р.

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

у рамках Цільової комплексної програми НАН України з наукових
космічних досліджень на 2018-2022 рр.

**«Розроблення підходів нейропротекції при довготривалих космічних
місіях»**

етап 1:

**«Ефект помірної та глибокої гіпотермії як потенційного
нейропротектора при довготривалих космічних місіях на процеси, що
лежать у основі синаптичної передачі у нервових терміналях головного
мозку за нормальних умов».**

Науковий керівник проекту

Зав. відділу нейрохімії, проф., д.б.н.

Борисова Т.О.

Звіт затверджено Вченою радою Інституту біохімії НАНУ
Протокол від «__» грудня 2018 р. №

Київ – 2018

Список виконавців

Керівник НДР проф., д.б.н., зав.відділу		Борисова Т.О. (реферат, вступ, розділи 1,2, висновки, проведення експериментальної роботи по проекту)
с.н.с., к.б.н.		Позднякова Н.Г. (розділ 1,2, проведення експериментальної роботи по проекту)
с.н.с., к.б.н.		Крисанова Н.В. (розділ 1,2, проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж.		Пастухов А.О. (проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж.		Дударенко М.В. (проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж., к.б.н.		Борисов А.А. (проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж.		Галкін М.О. (проведення експериментальної роботи по проекту)
інж		Палієнко К.О.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. Об'єкти і методи досліджень.....	10
2. Результати досліджень.....	14
ВИСНОВКИ	20
ПУБЛІКАЦІЇ	21
Участь у роботі конференцій	22
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	24

РЕФЕРАТ

Стор.- 24, рисунків -3, таблиць-0, схем-0, літературних джерел-0.

Ключові слова: ДОВГОТРИВАЛІ КОСМІЧНІ МІСІЇ; НЕЙРОПРОТЕКЦІЯ; ТРАНСПОРТ ГЛУТАМАТУ; ГЛУТАМАТЕРГІЧНА НЕЙРОТРАНСМІСІЯ; МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ; НЕРВОВІ ТЕРМІНАЛІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Об'єкт дослідження – ключові характеристики нейропередачі у нервових терміналях головного мозку щурів за умов гіпотермії.

Мета роботи - розроблення стратегії та методології нейропротекції при довготривалих космічних місіях, яка базується на комплексному експериментальному дослідженні впливу терапевтичної гіпотермії, поєднаної з дією нових та існуючих нейроактивних препаратів, на нервові терміналі головного мозку в нормі та за умов зміненої гравітації.

Методи дослідження - флуоресцентна спектроскопія, радіоізотопний аналіз.

З метою визначення потенційної методології нейропротекції за умов довготривалих космічних місій досліджено вплив помірної та глибокої гіпотермії на баланс ключових процесів збуджуючої та гальмівної нейропередачі у центральній нервовій системі.

Порівняльний аналіз транспортер-залежного накопичення збуджуючого нейромедіатора глутамату та гальмівного нейромедіатора ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів показав, що початкова швидкість накопичення обох нейромедіаторів поступово зменшується за умов помірної та глибокої гіпотермії.

Порівняльний аналіз позаклітинного рівня глутамату та ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів виявив незначні зміни цього рівня за умов помірної та глибокої гіпотермії у порівнянні з нормотермією.

Тобто, за умов помірної та глибокої гіпотермії показаний дисбаланс транспортер-залежного накопичення збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів, проте позаклітинний рівень цих нейромедіаторів залишається майже незмінним, тобто збалансованим. Ці експериментальні дані є важливими для розроблення нової стратегії та методології нейропротекції для попередження розвитку ексайтотоксичності при довготривалих космічних місіях, яка базується на комбінації таргетних та неспецифічних підходів модуляції транспорту нейромедіаторів у нервових терміналях головного мозку. Продовження досліджень у даному напрямку дозволить посилити позицію України як космічної Держави з значним науковим потенціалом.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ЦНС – центральна нервова система

ЕДТА (EDTA) – етилендіамінтетраоцтова кислота

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

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

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

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

ВСТУП

На теперішній час розроблення стратегії нейропротекції є найбільш актуальним завданням, виконання якого зробить можливим пілотовані довготривалі космічні місії. Без спеціальних нейропротекторних підходів довготривалі позаземні пілотовані місії не є можливими.

Робота у даному напрямі передбачає розроблення стратегії та методології нейропротекції при довготривалих космічних місіях, яка базується на комплексному експериментальному дослідженні впливу терапевтичної гіпотермії, поєднаної з дією нових та існуючих нейроактивних препаратів, на нервові терміналі головного мозку в нормі та за умов зміненої гравітації. Розуміння основних механізмів, що лежать в основі нейротоксичного потенціалу навколишнього середовища, є необхідним першим кроком у захисті здоров'я екіпажу та прогнозування ризиків, що виникають в процесі дослідження космосу.

Помірна та глибока гіпотермія сьогодні успішно використовується для попередження ускладнень ішемічного інсульту та під час кардіохірургічних операцій на дузі аорти зі зменшенням церебрального кровотоку. Терапевтична гіпотермія давно відома як неспецифічний та потужний нейропротектор. На тваринних моделях було показано, що гіпотермія вдвічі зменшує розмір ділянки ураження церебральним інсультом, і цей факт став основою для подальших клінічних випробувань терапевтичної гіпотермії у пацієнтів з ішемічним інсультом [Mrozek et al., 2012]. Клінічні застосування терапевтичної гіпотермії продемонстрували зменшення смертності у перший тиждень після інсульту та відновлення неврологічних функцій, а також зменшення ушкоджень мозку, які виявляються комп'ютерною томографією [Kammersgaard et al., 2002]. Експериментальні дослідження та клінічний досвід свідчать про перспективність застосування терапевтичної гіпотермії навіть через декілька годин після гострого ішемічного ураження мозку. Знижена температура тіла має підтримуватися упродовж тривалого періоду

після інсульту для досягнення довгочасного нейропротекторного ефекту [Berger et al., 2002; Hertog et al., 2011]. Відомо, що температура впливає на роботу певних кальцієвих та потенціал-чутливих натрієвих каналів, на властивості нейрональної мембрани, синаптичні відгуки та вивільнення нейромедіаторів. Методом мікродіалізу Berger показав, що незначна гіпотермія (33°C) спричиняє зниження концентрації позаклітинного глутамату, пірувату, лактату та гліцеролу в ділянці пенумбри, проте не впливає на ділянку ядра інсульту [Berger et al., 2002]. Гіпотермія широко використовується в кардіохірургії під час операцій на дузі аорти зі зменшенням церебрального кровообігу. Однак, незважаючи на відновлення нейрокогнітивних функцій після зупинки кровообігу у разі застосування гіпотермії, фіксуються випадки, коли зниження температури може спричинити неврологічні ускладнення унаслідок гіпотермічного ураження нервової тканини [Englum et al., 2013].

Сьогодні в аерокосмічній спільноті розглядають медичну гіпотермію не тільки як потужний нейропротекторний підхід, що запобігає розвитку нейропатологій за умов дії космічної радіації, але і як засіб заощадження місця та маси космічного корабля.

Обґрунтовані стандартні параметри терапевтичної гіпотермії на сьогодні відсутні. Залишається нез'ясованою низка питань щодо застосування терапевтичної гіпотермії, найбільш важливим з яких є обґрунтування оптимальних температурних режимів. Таким чином, виявлення процесів, особливо чутливих до змін температур та вивчення механізмів нейропротекторної дії низьких температур сприятиме широкому застосуванню цього підходу у космічній медицині та є надзвичайно актуальним питанням.

Ця робота є логічним продовженням роботи наукового колективу проекту, що проводилась у рамках Цільової комплексної програми НАН України 2007-2011 рр та 2012-2017 рр. та базується на результатах наших попередніх досліджень. У рамках Цільової комплексної програми НАН

України 2007-2011 рр нами були виявлені зміни функціонування ЦНС, а саме синаптичної глутаматергічної та ГАМКергічної нейротрансмісії, та розвиток нейротоксичності за умов гіпергравітації (Krisanova and Borisova, *Advances in Space Research* 2008; Krisanova et al., *Neurochemistry Int*, 2009). У 2012-2017 рр у рамках Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень нашу увагу було зосереджено на аналізі впливу симулянтів місячного та марсіанського ґрунту JSC-1a (Orbital Technologies Corporation, Madison, USA) та виявлено розвиток нейротоксичності за дії карбонвмісного аналогу марсіанського пилу (Krisanova et al, *Astrobiology*, 2013, Pozdnyakova et al., *Microgravity science and technology*, 2017).

Основна частина

1. Об'єкти і методи досліджень

Матеріали

В роботі були використані наступні матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); EDTA, «Calbiochem» (США); фіколл-400, додецилсульфат натрію, амінооксиоцтова кислота; скловолоконні фільтри Whatman GF/C «Sigma» (США); L-[¹⁴C]глутамат, сцинтиляційні рідини ACS та OSC, «Amersham», (Велика Британія); [³H]ГАМК, «Perkin Elmer» (США).

Аналог марсіанського пилу JSC, Mars-1A виробництва компанії ORBITEC Orbital Technologies Corporation (Медісон, штат Вісконсин, США) містив (у %): SiO₂ (34.5), TiO₂ (3), Al₂O₃ (18.5), Fe₂O₃ (19), FeO (2.5), MnO (0.2), MgO (2.5), CaO (5), Na₂O (2), K₂O (0.5), P₂O₅ (0.7).

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.

Виділення синапсом з головного мозку щурів

Синаптосоми виділяли за методом Котмана із незначними модифікаціями. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона.

Оцінка мембранного потенціалу синапсом.

Для оцінки мембранного потенціалу ізольованих нервових закінчень був використаний флуоресцентний потенціал-чутливий зонд родамін 6G (Rh 6G). Флуоресцентні виміри проводились на спектрофлуориметрі Hitachi

MPF-4 при довжині 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). Потім реєстрували кінетику вивільнення зонду та новий стаціонарний рівень його флуоресценції. Кількісну оцінку мембранного потенціалу давали, розраховуючи так званий індекс мембранного потенціалу $F = F_t/F_0$, де F_t та F_0 – інтенсивності флуоресценції Rh 6G в присутності та за відсутності синаптосом.

Визначення накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами

Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами визначали наступним чином: зразки суспензії з концентрацією протеїну 250 мкг/мл преінкубували 10 хв, при 37°C, потім інкубували 5 хв. Реакцію ініціювали додаванням суміші L-глутамату та L-[¹⁴C]глутамату (0,1 мкКі/мл 251 мКі/ммоль), та інкубували при 37°C. Аліквоти відбирали через 1 хв, і швидко осаджували в мікроцентрифусі «Eppendorf» (20 с при 10 000 g). Накопичення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та солюбілізованого в SDS осаду за допомогою сцинтиляційного лічильника Delta 300 («Tracor Analytic», США) в сцинтиляційній рідині ACS (aqueous counting scintillate– сцинтиляційна рідина для водних зразків) (1,5 мл).

Визначення вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синаптосом

Суспензія синаптосом розводилася стандартним сольовим розчином так, що містила 1 мг протеїну/мл, і після 10 хв преінкубації при 37°C навантажувалася L-[¹⁴C]глутаматом (500 нМ, 238 мКі/ммоль) в кальцієвому стандартному сольовому розчині упродовж 10 хв. Після цього суспензія синаптосом відмивалася 10-ма об'ємами стандартного сольового розчину і розводилася до концентрації 1мг протеїну/мл і відразу використовувалася для визначення вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з синаптосом.

Аліквоти (120 мкл; 25-30 мкг навантажених $L^{-14}C$ глутаматом синаптосом), преінкубували 10 хв, при $37^{\circ}C$, потім інкубували 5 хв. Нестимульоване вивільнення $L^{-14}C$ глутамату з синаптосом у безкальцієвому середовищі визначали за 6 хв. Суспензію синаптосом швидко осаджували в мікроцентрифузі, та центрифугували при 10000 g протягом 20 с. Аліквоти надосаду (90 мкл) та солубілізованого додецилсульфатом натрію осаду (90 мкл) змішували з синтіляційною рідиною ACS (1,5 мл) та визначали радіоактивність за допомогою синтіляційного лічильника Delta 300 («Tracor Analytic», США). Загальний вміст радіоактивності визначали як суму радіоактивності у аліквоті надосаду та у аліквоті солубілізованого осаду.

Визначення накопичення [3H]ГАМК синаптосомами

В дослідях з акумуляції [3H]ГАМК синаптосомами стандартний сольовий розчин містив 100 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інгібітора ГАМК-трансамінази, для запобігання утворення метаболітів ГАМК. Концентрація протеїну синаптосом в пробі дорівнювала 200 мкг/мл, об'єм проби дорівнював 0,6мл. Синаптосоми преінкубували при $37^{\circ}C$ 5 хв, після чого ініціювали процес акумуляції внесенням суміші ГАМК (1мкМ ГАМК та 50 нМ - 0,2 мкКи/мл [3H]ГАМК). Через 1 хв аліквоти (0,5 мл) фільтрували через GF/C фільтри. Фільтри двічі промивали охолодженим стандартним сольовим розчином, висушували та вимірювали рівень радіоактивності у сцинтиляційній рідині OCS в лічильнику Delta 300 («Tracor Analytic», США).

Визначення вивільнення [3H]ГАМК з синаптосом.

Синаптосоми (2 мг протеїну/мл) в оксигенованому стандартному сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інкубували 5 хвилин при $37^{\circ}C$ в присутності $5 \times 10^{-7}M$ (0,1 Ки/мл) [3H]ГАМК. Після охолодження на льоду, суспензію втричі розводили охолодженим сольовим розчином і центрифугували при 4000 g 5 хвилин. Осад суспендували при температурі $4^{\circ}C$ і концентрації протеїну 1 мг/мл в

сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти. Синаптосоми, що акумулювали [³H]ГАМК (1 мг протеїну/мл), негайно використовували для вивчення процесів вивільнення ГАМК. Синаптосоми (120 мкл суспензії) преінкубували 10 хв, при 37°C, потім інкубували 5 хв. Зразки інкубували ще 5 хв, після чого центрифугували у мікроцентрифузі Eppendorf (10,000 g, 20 с). Рівень радіоактивності вивільненої [³H]ГАМК в аліквотах супернатанту (90 мкл) вимірювали в лічильнику Delta 300 («Tracor Analytic», США) з використанням сцинтиляційної рідини ACS (1 мл на 1 аліквоту). Вміст міченої ГАМК у супернатантах був виражений у відсотках від загального вмісту [³H]ГАМК в синаптосомах.

Статистична обробка результатів

Результати представлені як середнє \pm S.E.M. в n незалежних експериментах. Різниця між двома групами порівнювали за допомогою t-критерія Стьюдента. Різниця вважалася значущою при $P \leq 0,05$. Статистична обробка даних, побудова графіків і розрахунки функцій проводили з використанням програми Excel.

2. Результати досліджень

У 2018 році на 1 етапі виконання проекту нами було досліджено вплив помірної та глибокої гіпотермії на транспортер-залежне накопичення та позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату та [^3H]ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів. У дослідженнях використовували препарат ізольованих нервових терміналей, одержаних послідовним диференційним центрифугуванням і центрифугуванням у градієнті густини фіколу-400 (Sigma) [Cotman, 1974].

Показано, що помірна та глибока гіпотермія викликають суттєві зміни початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами (рис. 1).

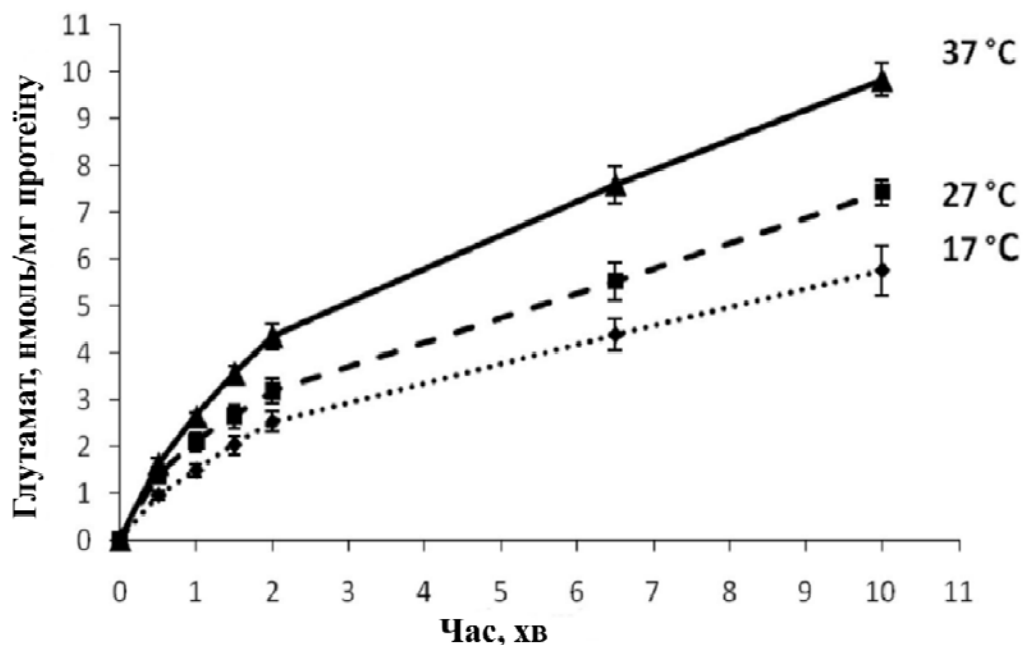


Рис. 1. Динаміка накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами за умов гіпотермії. Досліджували 6 препаратів синаптосом, кожен експеримент проводився у трьох повторах.

Початкова швидкість накопичення синаптосомами L-[^{14}C]глутамату складала $2,63 \pm 0,08$ нмоль/(хв \times мг) протеїну при 37 °C. Зменшення температури до 27 °C спричиняло зниження швидкості накопичення до 2,09

$\pm 0,2$ нмоль/(хв \times мг) протеїну, а в умовах 17 °С – подальше зниження до $1,48 \pm 0,12$ нмоль/(хв \times мг) ($P \leq 0,05$, t-тесту Ст'юдента, $n = 6$). Накопичення L-[14 C]глутамату синапсосомами на десятій хвилині складало $9,83 \pm 0,35$ нмоль/мг протеїну (37 °С), $7,42 \pm 0,27$ нмоль/мг протеїну при 27 °С та $5,75 \pm 0,52$ нмоль/мг протеїну при 17 °С ($P \leq 0,05$, t-тесту Ст'юдента, $n = 6$). Зміни динаміки накопичення синапсосомами L-[14 C]глутамату слугують доказом, що помірна та глибока гіпотермія суттєво гальмують зазначений процес.

Певна концентрація позаклітинного глутамату в нервових терміналях підтримується протилежно спрямованими процесами накопичення та вивільнення. Рівень позаклітинного L-[14 C]глутамату в препараті синапсосом вимірювали на 14-тій хвилині після нагрівання або охолодження синапсосом (рис. 2).

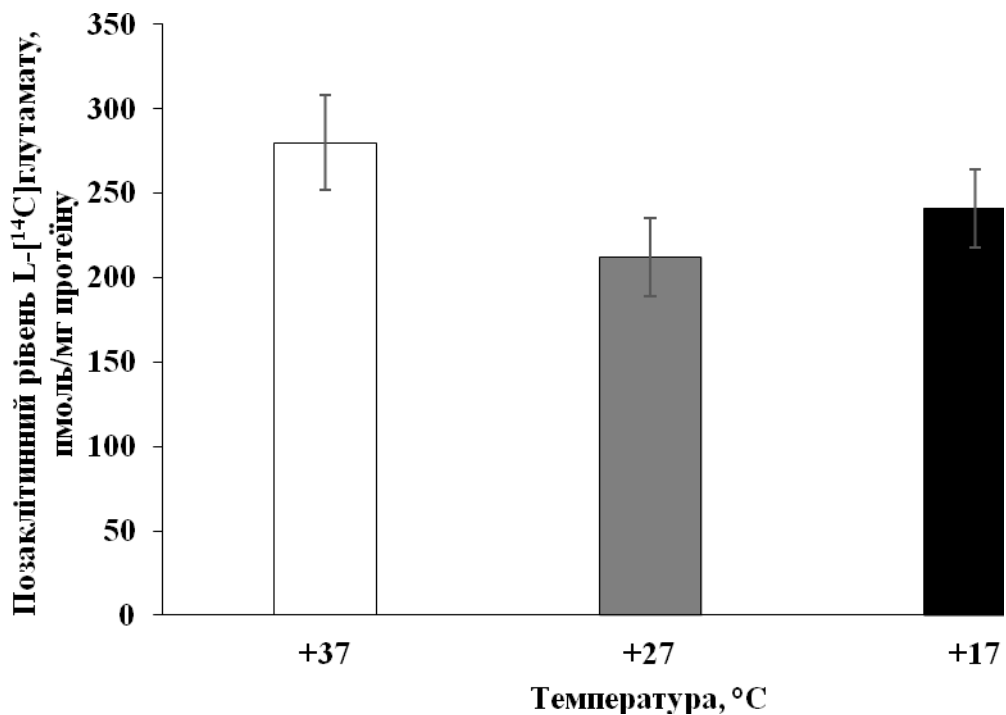


Рис. 2. Рівень позаклітинного L-[14 C]глутамату у середовищі інкубації синапсосом за умов гіпотермії. Вимірювання проводилось на 14-тій хвилині.

Для отримання репрезентативних експериментальних даних провели понад 30 експериментів (кожен експеримент проводився в трьох повторах) з синапсосомними препаратами ізольованими із різних щурів. Така кількісна

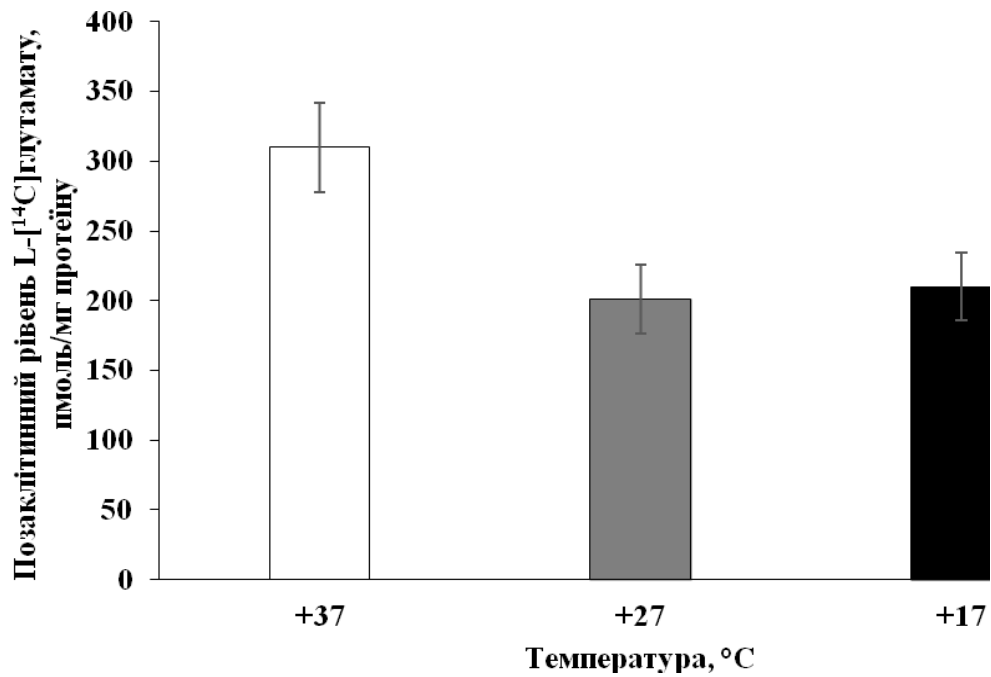
вибірка є на порядок вище, ніж для звичайних вимірювань за іншими параметрами.

Як свідчать результати (рис. 2) середній рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату змінювався у незначній мірі в умовах зниження температури. У чотирнадцятихвилинний термін після нагрівання або охолодження відповідно холодних або теплих синапсом рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату сягав 280 ± 28 пмоль/мг протеїну (37 °C), 212 ± 23 пмоль/мг протеїну – при 27 °C та 241 ± 23 пмоль/мг протеїну – при 17 °C ($n = 30$).

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що в порівнянні з суттєвим інгібуванням накопичення та тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату, рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату змінювався незначно за умов помірної/глибокої гіпотермії. Єдине можливе пояснення цього факту полягає в тому, що тонічне вивільнення зменшувалося з тією ж ефективністю як і накопичення L-[¹⁴C]глутамату в синапсомах.

В частині дослідів рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату знижувався за умов гіпотермії (рис. 3, А), в частині – збільшувався (рис. 3, Б). Статистичний аналіз експериментальних даних обох груп підтвердив відсутність значимої різниці між контрольними синапсомами та синапсомами за умов гіпотермії. Цей факт можна пояснити унікальністю балансу вивільнення/накопичення в кожному синапсі, що визначається індивідуальними синаптичними характеристиками, такими як кількість і розподіл глутаматних транспортерів, ліпідний склад плазматичної мембрани та енергетичний статус нервових терміналей. Як наслідок, у одних тварин зниження накопичення переважає над зниженням тонічного вивільнення L-[¹⁴C]глутамату у нервових терміналях, а у інших – навпаки.

А



Б

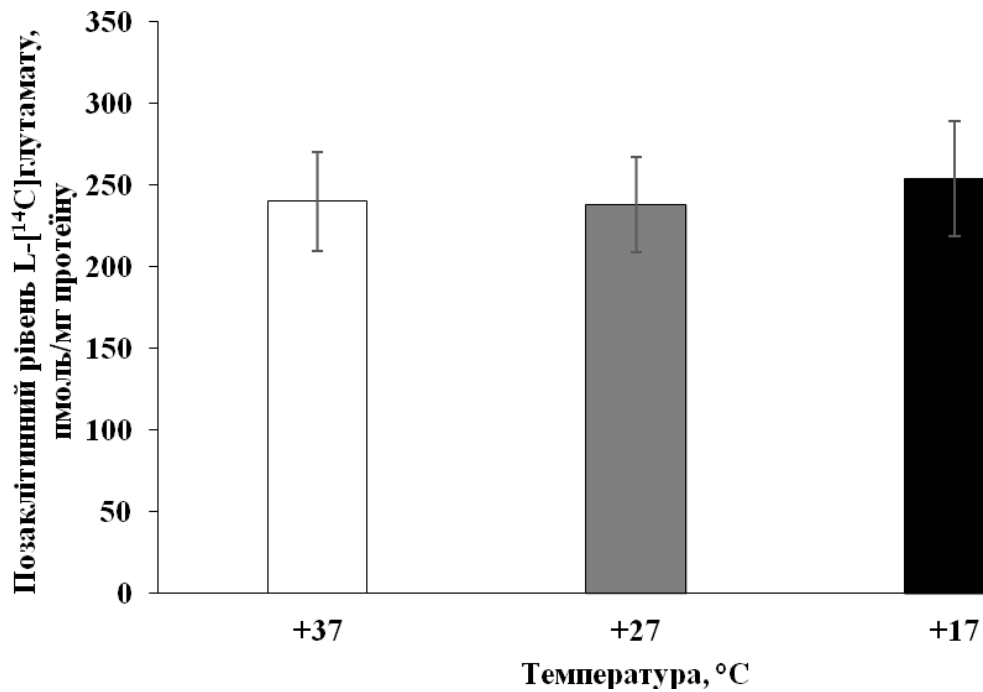


Рис. 3. Рівень позаклітинного L-[¹⁴C]глутамату у середовищі інкубації синапсом за умов гіпотермії з тенденцією до зниження (А) і до зростання (Б). Вимірювання проводилось на 14-тій хвилині.

Також було досліджено вплив помірної та глибокої гіпотермії на транспортер-залежне накопичення та позаклітинний рівень [³H]ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів. Показано, що аналогічно з експериментами з L-[¹⁴C]глутаматом початкова швидкість накопичення синаптосомами [³H]ГАМК знижувалась на 15% при зменшенні температури до 27 °C та ще на 15% при подальшому зниженні температури до 17 °C.

При дослідженні позаклітинного рівня [³H]ГАМК також було продемонстровано, що цей рівень не є чутливим до дії гіпотермії.

За матеріалами проекту у звітний період було опубліковано 8 статей, з них 4 статті у фахових зарубіжних виданнях та 1 глава у монографії видавництва «Шпрингер» та 2 тези доповідей.

Продовження досліджень у даному напрямку дозволить детально розробити нову стратегію та методологію нейропротекції для попередження розвитку ексайтотоксичності, яка базується на комбінації таргетних та неспецифічних підходів модуляції транспорту нейромедіаторів у нервових терміналях головного мозку. Планується пошук та скринінг нових синтетичних та природних нейроактивних сполук з таргетною антиексайтотоксичною, нейропротекторною та антиепілептичною дією. Пріоритетні завдання для подальшої роботи: 1) аналіз впливу помірної та глибокої терапевтичної гіпотермії як потенційного нейропротектора при довготривалих космічних місіях на процеси, що лежать в основі синаптичної передачі у нервових терміналях головного мозку за нормальних умов, 2) аналіз впливу помірної та глибокої гіпотермії на патологічні процеси, що розвиваються під час впливу зміненої гравітації на нервову систему та за умов гіпоксії та ішемії, 3) визначення можливих ризиків використання гіпотермії у космічній медицині, 4) скринінг ефектів вже наявних медичних препаратів та нових синтезованих нейроактивних сполук на процес глутаматергічної та ГАМКергічної нейропередачі з метою отримання синергічного нейропротекторного ефекту разом з гіпотермією, 5) модуляція фізико-хімічних властивостей мембран нервових клітин шляхом зміни їх

ліпідного складу з метою попередження збільшення патологічного транспортопосередкованого вивільнення глутамату, 6) розробка методології комбінованої нейропротекції, 7) використання гіпотермії та модуляції фізико-хімічних параметрів плазматичної мембрани клітин для зниження шкідливого впливу частинок планетарного пилу. Особливе значення має дослідження впливу гіпотермії на ключові процеси, які лежать у основі синаптичної передачі, за умов зміненої гравітації. Оскільки відомо, що за умов зміненої гравітації суттєво змінюються фізико-хімічні властивості біологічних мембран, як наслідок, може змінюватися і нейропротекторний ефект гіпотермії. Вважаємо, що розроблення підходів нейропротекції, що можуть бути використані при довготривалих космічних місіях, є значним внеском в позицію України як потужної космічної Держави зі значним науковим потенціалом.

ВИСНОВКИ

З метою визначення потенційного нейропротектора при довготривалих космічних місіях досліджено вплив помірної та глибокої гіпотермії на баланс збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів у центральній нервовій системі.

Порівняльний аналіз транспортер-залежного накопичення збуджуючого нейромедіатору глутамату та гальмівного нейромедіатору ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів показав, що початкова швидкість накопичення обох нейромедіаторів поступово зменшується за умов помірної та глибокої гіпотермії.

Порівняльний аналіз позаклітинного рівня глутамату та ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів виявив незначні зміни цього рівня за умов помірної та глибокої гіпотермії у порівнянні з нормотермією.

Тобто, за умов помірної та глибокої гіпотермії показаний дисбаланс транспортер-залежного накопичення збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів, проте позаклітинний рівень цих нейромедіаторів залишається майже незмінним, тобто збалансованим.

Публікації 2018 по темі проекту - 8 статей, з них 4 статті у фахових зарубіжних виданнях та 1 глава у монографії видавництва «Шпрингер».

Статті у фахових зарубіжних виданнях, в яких зазначено, що дослідження проводились у рамках даного проекту:

1. T. Borisova Nervous system injury in response to contact with environmental, engineered and planetary micro- and nano-sized particles. **Frontiers in Physiology**, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00728
2. N. Krisanova, N. Pozdnyakova, A. Pastukhov, M. Dudarenko, O. Maksymchuk, P. Parkhomets, R. Sivko, T. Borisova Vitamin D3 deficiency in puberty rats causes presynaptic malfunctioning through alterations in exocytotic release and uptake of glutamate/GABA and expression of EAAC-1/GAT-3 transporters. **Food and Chemical Toxicology**.- 2019.-V.123.-P. 142-150.
3. Pastukhov A., Borisova T. Levetiracetam-mediated improvement of decreased NMDA-induced glutamate release from nerve terminals during hypothermia // **Brain Research**. – 2018. – Vol. 1699. – P. 69–78. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.06.032 .
4. Pastukhov A., Borisova T. Combined Application of Glutamate Transporter Inhibitors and Hypothermia Discriminates Principal Constituent Processes Involved in Glutamate Homo- and Heteroexchange in Brain Nerve Terminals // **Therapeutic hypothermia and temperature management**. – 2018. – Vol. 8. – P. 143–149. DOI: 10.1089/ther.2017.0047 .
5. Borysov A., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Borisova T. (2018) Comparative Analysis of Neurotoxic Potential of Synthesized, Native, and Physiological Nanoparticles. In: Santamaria F., Peralta X. (eds) Use of Nanoparticles in Neuroscience. Neuromethods, vol 135, **Springer**, New York, 2018, P.203-229. doi.org/10.1007/978-1-4939-7584-6_13,

Статті у вітчизняних виданнях:

6. Позднякова Н.Г., Пастухов А.О., Дударенко М.В., Галкін М.О., Сівко Р.В., Крисанова Н.В., Борисова Т.О. Збагачення неорганічного аналогу марсіанського пилу новітніми карбоновими наночастинками, отриманими при згоранні карбогідратів, та оцінка його нейротоксичності. // **Космічна наука і технологія.** – 2018. – Т. 24, № 2. – С.60-71.
7. Позднякова Н., Борисова Т. Оцінка нейротоксичності збагаченого новітніми карбоновими наночастинками неорганічного аналогу марсіанського пилу // Космічні дослідження в Україні. 2016-2018 / Наук. ред.: О.П. Федоров ; — К. : **Академперіодика**, ISBN 978-966-02-8589-7. — 2018. — С. 62-65.
8. Борисова Т.О., Крисанова Н.В., Позднякова Н.Г., Пастухов А.О., Борисов А.А., Дударенко М.В., Палієнко К.О., Шатурський О.Я. Розроблення нової універсальної методики оцінювання токсичності планетарного пилу для перспективних космічних місій // **Космічна наука і технологія.** – 2018. – Т. 24, № 6.

Тези:

1. 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. 46.
2. 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.

Участь у роботі конференцій

Троє вчених – виконавців проекту М. Дударенко, К. Палієнко та Н. Позднякова брали участь у роботі 18 Української конференції з космічних досліджень, яка проходила у Києві. Були представлені усна та стендові доповіді за результатами, отриманими під час реалізації цього проекту.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

Berger C, Schäbitz W-R, Georgiadis D, Steiner T, Aschoff A, Schwab S. Effects of hypothermia on excitatory amino acids and metabolism in stroke patients: a microdialysis study. *Stroke*. 2002;33:519–24.

Englum BR, Andersen ND, Husain AM, Mathew JP, Hughes GC. Degree of hypothermia in aortic arch surgery—optimal temperature for cerebral and spinal protection: deep hypothermia remains the gold standard in the absence of randomized data. *Ann Cardiothorac Surg*. 2013;2:184–93.

Kammersgaard LP, Jørgensen HS, Rungby JA, Reith J, Nakayama H, Weber UJ, Houth J, Olsen TS. Admission body temperature predicts long-term mortality after acute stroke: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke*. 2002;33:1759–62.

Mrozek S, Vardon F, Geeraerts T. Brain temperature: physiology and pathophysiology after brain injury. *Anesthesiol Res Pract*. 2012;2012:989487.

den Hertog HM, van der Worp HB, van Gemert HMA, Algra A, Kappelle LJ, van Gijn J, Koudstaal PJ, Dippel DWJ. An early rise in body temperature is related to unfavorable outcome after stroke: data from the PAIS study. *J Neurol*. 2011;258:302–7.