

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

№ держреєстрації 0112 U 004255

Інв. № 8-19/15

## 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

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 р.

### АНОТОВАНИЙ ЗВІТ ПРО ВИКОНАННЯ НАУКОВОГО ЗАВДАННЯ

**«Вплив неорганічних наночастинок аналогів місячного та марсіанського ґрунту на нервові закінчення головного мозку та клітини крові: оцінка біомодулюючих властивостей та токсичної дії»**

**етап 3:**

**«За умов нормальної та зміненої гравітації провести модуляцію фізико-хімічних параметрів клітинних мембрани та дослідити вплив на них симулянтів місячного та марсіанського ґрунту та пилу та їх окремих компонентів».**

Науковий керівник проекту

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

Борисова Т.О.

Звіт затверджено Вченою радою Інституту біохімії НАНУ  
Протокол від « 8 » грудня 2015 р. № 12

Київ – 2015

Нещодавній *nanoSIMS*-аналіз вуглецю з Тісінтського марсіанського метеориту надав докази існування в минулому підземних органічних рідин на Марсі (Lin et al., *Meteoritics & Planetary Science*, 2014). Наявність органічних речовин, інкапсульованих у внутрішніх лакунах, наводить на думку, що вони утворилися ще до падіння, і це є надійним доказом їх марсіанського походження та відсутності земного забруднення. Ці органічні речовини можуть бути результатом осадження багатих на органіку рідин біля поверхні Марсу (Lin et al., *Meteoritics & Planetary Science*, 2014). Крім того, щодня на Землю падають тонни вуглецевих молекул в частинках пилу та в метеоритах.

Частинки місячного ґрунту сорбувалися на скафандрах і потрапляли всередину космічних кораблів (Rehders та ін., 2011; Wallace та ін, 2009). Було показано, що при вдиханні ультрадисперсні частинки затримуються в носовій порожнині та дихальних шляхах, і можуть переноситись в центральну нервову систему. Тривалість дії пилу при довгостроковій місії, особливо в поєднанні з іншими шкідливими для людини факторами, зокрема зміненою гравітацією, радіацією, УФ і т.д., може посилити його шкідливий вплив. Тому оцінка нейротоксичного потенціалу місячного та марсіанського пилу є однією з актуальних задач сучасної космічної нейробіології.

Порушення гомеостазу нейромедіаторів збудження та гальмування (глутамату та ГАМК) у центральній нервовій системі є одним з основних аспектів патогенезу багатьох неврологічних захворювань. Надзвичайно важливим є оцінка впливу симулянтів місячного та марсіанського пилу на ключові характеристики глутаматергічної та ГАМКергічної нейротрансмісії за умов гіпергравітації.

У звітний період дослідження було зосереджено по-перше на модуляції фізико-хімічних параметрів клітинної мембрани за умов норми та гіпергравітації, а по-друге аналізу сумісної дії неорганічного аналогу марсіанського пилу та карбонових точок на  $\text{Na}^+$ -залежне поглинання нейромедіатору нервовими терміналами головного мозку.

Для краніо-каудального гіпергравітаційного навантаження (1 година, 10g) статевозрілих самців щурів Wistar вагою 100-120 г було спеціально сконструйовано та виготовлено центрифугу з діаметром ротору 5,5 м. У дослідженнях використовували препарат ізольованих нервових терміналей, одержаних послідовним диференційним центрифугуванням і центрифугуванням у градієнті густини фіколу-400 (Sigma) (Cotman, 1974).

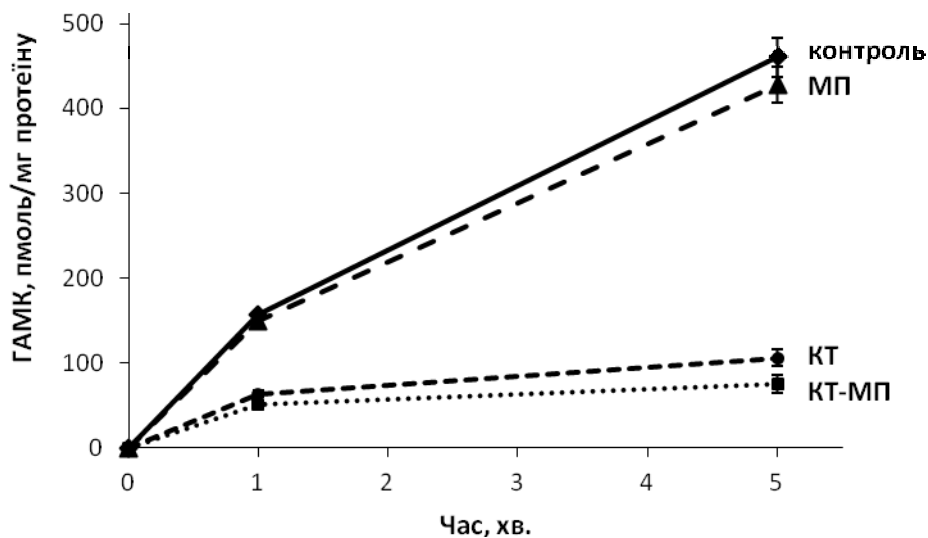
Модуляцію фізико-хімічних параметрів клітинної мембрани проводили за допомогою метил- $\beta$ -циклодекстрину (МЦД), циклічного олігосахариду, якій є специфічним акцептором холестеролу. Видалення холестеролу за допомогою МЦД являє собою складний багатостадійний процес. Кінетика процесу видалення холестеролу із мембрани за допомогою МЦД свідчить про наявність двох пулів холестеролу – швидкого з напівперіодом транспорту 19-23 с та повільного з напівперіодом транспорту 15-30 хв. Вважається, що за рахунок транспорту холестеролу із внутрішньоклітинних депо швидкий пул холестеролу може повністю відновлюватися протягом 40 хв.

У першій серії експериментів показано, що видалення чверті мембранного холестеролу з нервових терміналей контрольних щурів та щурів, що зазнали гравітаційного навантаження, призводить до зниження початкової швидкості накопичення 10 мкМ L-[ $^{14}$ C]глутамату нервовими терміналами головного мозку з  $2,5 \pm 0,1$  нмоль/хв/мг білка до  $0,9 \pm 0,1$  нмоль/хв/мг білка (у контролі) ( $P \leq 0,05$ ,  $n=5$ , t-тест Стьюдента) та з  $2,0 \pm 0,1$  нмоль/хв/мг білка до  $0,5 \pm 0,1$  нмоль/хв/мг білка (після гіпергравітаційного навантаження) ( $P \leq 0,05$ ,  $n=5$ , t-тест Стьюдента).

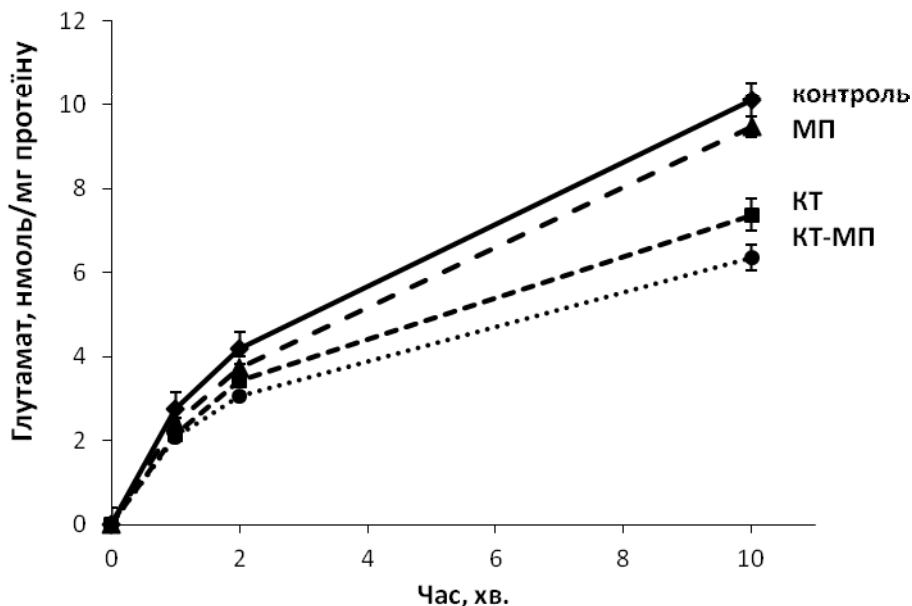
З використанням міченого L-[ $^{14}$ C]глутамату показано збільшення транспортер-опосередкованого вивільнення L-[ $^{14}$ C]глутамату з нервових закінчень головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження. Наявність симулянтів місячного та марсіанського пилу у середовищі інкубації суттєво не впливає на транспортер-опосередковане вивільнення L-[ $^{14}$ C]глутамату з контрольних та «гравітаційних» нервових закінчень.

Наночастинки симулянтів місячного та марсіанського пилу з магнітними властивостями не зв'язуються з синапсами, що показано методом електронного парамагнітного резонансу.

У другій серії досліджень була проаналізована сумісна дія неорганічного аналогу марсіанського пилу та карбонових точок на  $\text{Na}^+$ -залежне поглинання нейромедіатора нервовими терміналями головного мозку. Оскільки нативний марсіанський пил може включати в себе вуглець органічного походження, було розроблено новий аналог марсіанського пилу, комбінуючи вуглець (карбонові точки, синтезовані з глютамінової кислоти шляхом нагрівання за особливих умов) та неорганічний аналог марсіанського пилу, отриманого з вулканічного попелу (JSC-1a/JSC, Orbitec Orbital Technologies Corporation, Madison, Wisconsin). Оцінювали ефект цього стимулятора на ключові характеристики синаптичної нейротрансмісії. Дослідження були зосереджені на аналізі комбінованого впливу вищевказаних компонентів на  $\text{Na}^+$ -залежне поглинання  $[\text{}^3\text{H}]\text{ГАМК}$ , яке є одним з найважливіших характеристик ГАМК-ергічної передачі. ГАМК є основним гальмівним нейромедіатором і, відповідно, бере участь у більшості аспектів нормального функціонування мозку, тоді як порушення гомеостазу ГАМК робить внесок у патогенез основних неврологічних розладів. Додавання суміші карбонові точки/аналог марсіанського пилу (2 мг/мл і 2 мг/мл, відповідно) призводило до зменшення інтенсивності поглинання  $[\text{}^3\text{H}]\text{ГАМК}$  (Рис.1) та  $\text{L}-[\text{}^{14}\text{C}]\text{глютамату}$  (Рис.2) нервовими терміналями головного мозку. Було показано, що цей ефект був пов'язаний виключно з активністю карбонових точок, але не з неорганічною компонентою аналога. Цей факт вказує на те, що карбонова компонента нативного марсіанської пилу може мати шкідливий вплив на позаклітинний гомеостаз ГАМК в ЦНС, який є вкрай важливим для правильної синаптичної передачі.



**Рис.1** Накопичення [ $^3\text{H}$ ]ГАМК нервовими терміналами головного мозку за присутності карбонових точок (КТ) у концентрації 2мг/мл та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2мг/мл.



**Рис.2** Накопичення L- $[^{14}\text{C}]$ глутамату нервовими терміналами головного мозку за присутності карбонових точок (КТ) у концентрації 2мг/мл та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2мг/мл.

Отже, місячний та марсіанський пил не змінюють транспортер-опосередковане вивільнення глутамату з нервових терміналей, ізольованих з головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження. Таким чином, за умов гіпергравітації місячний пил порушує гомеостаз глутамату в центральній нервовій системі за рахунок збільшення зв'язування нейромедіатора з нервовими терміналями головного мозку, але не впливає на транспортер-опосередковане вивільнення з них глутамату.

Найбільш важливим є те, що карбонова компонента нативного марсіанської пилу може мати шкідливий вплив на позаклітинний гомеостаз нейромедіаторів в ЦНС, і токсична дія карбонових структур у складі марсіанського пилу може бути значно більшою у порівнянні з його неорганічної компонентою.

За матеріалами проекту у звітний період було опубліковано 4 статті з них три у зарубіжних фахових наукових журналах та одна в українському науковому виданні та 2 тези доповідей.

Таким чином, за три роки реалізації проекту накоплений значний експериментальний матеріал, опублікований у 6 фахових зарубіжних виданнях (*Astrobiology*, 2013, *Beilstein J. Nanotechnol*, 2014, *Croat. Med. Journal*, 2014, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2015 (impact factor - 4,5); *Talanta* 2015 (3,7); *Reviews in the Neurosciences* 2015 (3,5)).

Продовження досліджень у даному напрямку дозволить детально з'ясувати токсичний потенціал місячного та марсіанського пилу неорганічного походження та оцінити механізм біомодулюючої дії карбонових структур у його складі та їх внесок у токсичність пилу, а також проаналізувати нейроактивні властивості пилу, особливі ефекти карбонових точок, нанодіамантів та синтезованих наночастинок магеміта у складі марсіанського пилу, та розробити стратегію його використання в космічній біотехнології, що буде значним внеском в позицію України як потужної космічної Держави з значним науковим потенціалом.

**Ключові слова:** АНАЛОГ МІСЯЧНОГО ПИЛУ; АНАЛОГ МАРСІАНСЬКОГО ПИЛУ; ТРАНСПОРТ ГЛУТАМАТУ; ГЛУТАМАТЕРГІЧНА НЕЙРОТРАНСМІСІЯ; МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ; НЕРВОВІ ТЕРМІНАЛІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ; ГІПЕРГРАВІТАЦІЙНЕ НАВАНТАЖЕННЯ ТВАРИН

**Публікації 2015 по темі проекту (4 статті та 2 тези):**

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

1) Borisova T, Nazarova A, Dekaliuk M, Krisanova N, Pozdnyakova N, Borysov A, Sivko R, Demchenko AP. 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.203-15.

2) O. Soldatkin, A. Nazarova, N. Krisanova, A. Borysov, D. Kucherenko, I. Kucherenko, N. Pozdnyakova, A. Soldatkin, T. Borisova Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. Talanta -2015-V 135.-P. 67–74.

3) T. Borisova Permanent dynamic transporter-mediated turnover of glutamate across the plasma membrane of presynaptic nerve terminals: arguments for and against. Reviews in the Neurosciences.-2015.- DOI: 10.1515/revneuro-2015-0023

4) N. Pozdnyakova, A. Pastukhov, M. Dudarenko, A. Nazarova, A. Borysov, N. Krisanova, T. Borisova Enrichment of inorganic Martian dust simulant with carbon provokes neurotoxicity - *статтю подано у міжнародний науковий журнал*

**Стаття у вітчизняному виданні, в якій зазначено, що дослідження проводились у рамках даного проекту:**

А. Г. Назарова, Н. Г. Позднякова, О. О. Воронова, О. Ю. Чуніхін, М. В. Піскова, А. О. Пастухов, А. А. Борисов, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова  
Оцінка біомодуляторних властивостей та нейротоксичності аналогу місячного ґрунту. Космічна наука і технологія. 2015. Т. 21. № 4 С.103-111.

**Тези:**

- 1) M. Dudarenko, A. Pastukhov, O.Krupko, N. Pozdnyakova, A. Nazarova, A. Borysov, N. Krisanova, M.Dekaliuk, T. Borisova Combined effects of burned organic carbon and inorganic Martian dust analogue on Na<sup>+</sup>-dependent neurotransmitter uptake by brain nerve terminals. 15-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень 2015, Збірник тез, С.38.
- 2) O.Krupko, N. Pozdnyakova, M. Dudarenko, N. Krisanova, T. Borisova High-affinity sodium-dependent uptake and exocytotic release of [3H]GABA from nerve terminals under centrifuge-induced hypergravity. 15-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень 2015, Збірник тез, С.45.

**Участь у роботі конференцій**

Три молодих вчених - виконавців проекту М.Дударенко, О.Крупко та А.Пастухов брали участь у роботі 15 Української конференції з космічних досліджень, яка проходила в Одесі. Були представлені усна та стендова доповіді за результатами, отриманими при реалізації цього проекту. Усна доповідь «High-affinity sodium-dependent uptake and exocytotic release of [3H]GABA from nerve terminals under centrifuge-induced hypergravity», стендова «Combined effects of burned organic carbon and inorganic Martian dust analogue on Na<sup>+</sup>-dependent neurotransmitter uptake by brain nerve terminals».