

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

№ держреєстрації 0112 U 004255

Інв. № 8-19

## 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

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 р.

### 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»**

***Назва програми:*** «Цільова комплексна програма НАН України з наукових космічних досліджень на 2012-2016 рр.»

Науковий керівник проекту

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

Борисова Т.О.

Звіт затверджено Вченою радою Інституту біохімії НАНУ  
Протокол від «24» травня 2016 р. №

Київ – 2016

**Список виконавців**

Керівник НДР проф., д.б.н., зав.відділу	Т.О. Борисова (реферат, вступ, розділи 1,2 висновки, проведення експериментальної роботи по проекту)
с.н.с.	Позднякова Н.Г. (розділ 2, проведення експериментальної роботи по проекту)
н.с	Крисанова Н.В. (розділ 2, проведення експериментальної роботи по проекту)
м.н.с	Сівко Р.В. (проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж.	Борисов А.А. (проведення експериментальної роботи по проекту)
пров.інж.	Назарова А.Г. (проведення експериментальної роботи по проекту)

## ЗМІСТ

<b>РЕФЕРАТ.....</b>	<b>5</b>
<b>СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>8</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>9</b>
<b>ОСНОВНА ЧАСТИНА .....</b>	<b>14</b>
<b>РОЗДІЛ 1 Матеріали та методи дослідження .....</b>	<b>12</b>
<b>РОЗДІЛ 2 Результати досліджень.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Аналіз біомодулюючих властивостей та токсичної дії аналогів місячного та марсіанського ґрунту (пилу) за умов незміненої гравітації... 18</b>	
2.1.1. Аналіз симулянтів місячного та марсіанського ґрунту (пилу) та синаптосом за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії .....	18
2.1.2. Оцінка зв'язування L-[ <sup>14</sup> C]глутамату з симулянтами місячного та марсіанського пилу.....	23
2.1.3 Накопичення L-[ <sup>14</sup> C]глутамату синаптосомами в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу.....	24
2.1.4 Мембранний потенціал нервових закінчень у присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу.....	26
2.1.5 Протонний градієнт синаптичних везикул в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу.....	28
2.1.6 Зв'язування L-[ <sup>14</sup> C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу.....	29
2.1.7 Зв'язування L-[ <sup>14</sup> C]глутамату з нервовими закінченнями в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу в умовах низьких температур.....	31
2.1.8 Модуляція фізико-хімічних параметрів плазматичної мембрани клітин для аналізу можливості зниження шкідливого впливу наночастинок.....	32
<b>2.2. Аналіз біомодулюючих властивостей та токсичної дії аналогів місячного та марсіанського пилу за умов гіпергравітації.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Характеристика препарату синаптосом, одержаних від контрольних тварин та тварин, що зазнали гравітаційного навантаження.....	35

2.2.1.1. Характеристика препарату синаптосом, отриманих з тварин після гіпергравітаційного навантаження, методом лазерної кореляційної спектроскопії.....	36
2.2.1.2. Аналіз препаратів синаптосом, одержаних з контрольних тварин та тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження, методом проточної цитометрії .....	36
2.2.1.3. Оцінка мембранного потенціалу нервових закінчень, одержаних з контрольних тварин та тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження.....	38
2.2 2. Визначення накопичення глутамату синаптосомами в нормі та за умов гіпергравітації.....	39
2.2.3 Вплив симулянтів місячного та марсіанського пилу на накопичення L-[ <sup>14</sup> C]глутамату синаптосомами, одержаними з тварин, що зазнали гравітаційного навантаження .....	42
2.2.4 Мембранний потенціал нервових закінчень, одержаних з тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження, у присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу.....	43
2.2.5 Зв'язування L-[ <sup>14</sup> C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями, отриманими з головного мозку тварин, що зазнали гравітаційного навантаження, в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту.....	43
2.2.6 Оцінка зв'язування симулянтів місячного та марсіанського пилу з нервовими терміналами та тромбоцитами методом лазерної кореляційної спектрометрії.....	44
2.2.7 Оцінка зв'язування симулянтів місячного та марсіанського пилу з нервовими терміналами методом електронного парамагнітного резонансу ..	47
2.2.8 Оцінка комбінованого впливу гіпергравітації та аналогів місячного та марсіанського пилу на вивільнення L-[ <sup>14</sup> C]глутамату з нервових закінчень головного мозку та закислення внутрішньоклітинних компартментів нервових терміналей .....	49

<b>2.3. Попередні експерименти щодо створення карбонвмісного аналогу марсіанського пилу та оцінки його впливу на транспортер-залежне накопичення нейромедіаторів нервовими терміналями головного мозку щурів.....</b>	<b>51</b>
<b>РОЗДІЛ 3 Обговорення результатів.....</b>	<b>54</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>58</b>
<b>СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>60</b>
<b>ПУБЛІКАЦІЇ.....</b>	<b>64</b>
<b>Участь у роботі конференцій.....</b>	<b>66</b>
<b>Розвиток матеріально-технічної бази досліджень.....</b>	<b>67</b>

## РЕФЕРАТ

Стор.- 67, рисунків-20, таблиць-1, схем-0, літературних джерел-31.

Шкідливий вплив місячного та марсіанського ґрунту/пилу на тканини, що безпосередньо зазнають його дії, добре описані в літературі, в той час як його дія на тканини після перерозподілу його частинок в організмі тільки починає досліджуватись. При вдиханні, ультрадисперсні частинки затримуються в носовій порожнині та дихальних шляхах, і можуть переноситись в центральну нервову систему (ЦНС). Нейротоксичний потенціал місячного та марсіанського пилу досі не оцінений. Відомо, що глутамат є головним збуджуючим нейромедіатором в ЦНС ссавців, який бере участь у багатьох процесах нормального функціонування мозку. Порушення гомеостазу глутамату є одним з основних аспектів патогенезу багатьох нейрологічних захворювань.

Дослідження було зосереджено на аналізі впливу симулянтів місячного та марсіанського ґрунту/пилу на ключові характеристики глутаматергічної нейротрансмісії. Оцінку розміру частинок симулянтів (зокрема і фракції частинок з малим діаметром) до і після обробки ультразвуком визначали методом фотонної кореляційної спектроскопії. З використанням міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату, було показано, що в присутності симулянта місячного пилу зростає зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів (синапсосомами) в середовищі з низькою концентрацією Na<sup>+</sup> та за низької температури (+4°C). В присутності симулянта марсіанського пилу та наночастинок магнетиту змін у зв'язуванні L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсосомами не спостерігається. В експериментах з використанням потенціал - та рН-чутливого флуоресцентних зондів було показано, що в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу, а також наночастинок магнетиту, синапсосоми зберігають здатність підтримувати мембранний потенціал та протонний градієнт синаптичних везикул. Методом електронного парамагнітного резонансу показано, що фракції симулянтів місячного та марсіанського пилу з магнітними

властивостями не зв'язуються з синапсами, тобто підвищення зв'язування глутамату з синапсами у присутності симулянтів не пов'язано з компонентами пилу, які мають магнітні властивості. При цьому методом лазерної кореляційної спектроскопії показано збільшення середнього діаметру нервових терміналей та тромбоцитів в присутності симулянту місячного пилу, що свідчить про зв'язування симулянтів з нервовими терміналями та тромбоцитами.

Поєднання постійного подразнення від контакту з частинками ґрунту, особливо у довгострокових місіях, а також супутнє запалення, стрес, змінена гравітація, підвищена радіація, УФ і т.д. можуть посилити токсичність ґрунту. Тому проведено дослідження щодо сумісної дії симулянтів пилу та гіпергравітації. Показано, що в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу нервові терміналі, отримані з головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження, зберігають здатність підтримувати мембранний потенціал. В присутності симулянта місячного пилу в середовищі з низькою концентрацією  $\text{Na}^+$  зростає зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з нервовими закінченнями, ізольованими з головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження.

Отже, ефект симулянту місячного пилу є унікальним у порівнянні з симулянтом марсіанського пилу та наночастинками магнетиту. Викликаючи зміни позаклітинного рівня глутамату, який є вкрай важливим для правильної синаптичної передачі, місячний пил може мати шкідливий вплив на гомеостаз цього нейромедіатора в ЦНС. У довгострокових місіях поєднання умов зміненої гравітації з постійним контактом з частинками пилу можуть посилити його токсичну дію.

За матеріалами проекту опубліковано 8 статей, з них 7 - у міжнародних фахових виданнях з сумарним «імпакт» фактором 19, а також 7 тез доповідей.

Продовження досліджень у даному напрямку дозволить детально з'ясувати токсичний потенціал місячного та марсіанського пилу, оцінити механізм біомодулюючої та нейроактивної дії пилу, відокремити особливі ефекти

магнітних наночастинок та карбонових структур у його складі, а також розробити стратегію його використання в космічній біотехнології, що буде значним внеском в позицію України як потужної космічної Держави з значним науковим потенціалом.

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

### **СПИСОК СКОРОЧЕНЬ**

ГГ - гіпергравітація

ЕДТА – (EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid) етилендіамінтетраоцтова кислота

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

ЦНС - центральна нервова система



## ВСТУП

Гравітаційне поле є одним з факторів навколишнього середовища, що має значний вплив на формування в ході еволюції багатьох систем організму тварин. Життя зародилося в океані, і перші хребетні перебували в умовах, що нагадують мікрогравітацію (такий стан можна назвати псевдоневагомістю). З виходом тварин на сушу відбувся перехід в умови з підвищеним гравітаційним впливом і виникла потреба в механізмах, що протистоять силі тяжіння. Так, під впливом гравітації змінювалася опорно-рухова, серцево-судинна, нервова та інші системи. Однак гравітація – це єдиний фактор навколишнього середовища, що залишається незмінним не лише протягом онтогенезу, але і протягом філогенезу, що зумовлює відсутність механізмів адаптації до швидких змін гравітації. Однак з розвитком технічного прогресу, зокрема авіаційної та космічної галузі, створюються умови, за яких організм людини зазнає впливу зміненої гравітації.

Зміни гравітаційного навантаження впливають на реалізацію фізіологічних функцій організму. Так, у людини гравітаційно-чутливою є серцево-судинна система, оскільки дією сили тяжіння регулюється тиск крові у верхній частині тіла. Функція підтримки водно-сольового балансу в організмі також залежить від гравітації. На зниження сили тяжіння організм реагує зменшенням обсягу позаклітинної рідини. На сьогодні існує чимало підтверджень впливу зміненої гравітації на нервову систему. Перебування в умовах мікро- та гіпергравітації призводить до широкого діапазону змін в нервовій системі, як морфологічних (зменшення кількості синаптичних везикул, порушення цитоскелету, підвищення активності ферментів-нуклеозиддифосфаткінази та креатинкінази), так і функціональних (порушення моторних функцій - координації та точності рухів, та складних функцій мозку - асоціативних реакцій, когнітивних можливостей, пам'яті) [1].

Сьогодні активно досліджується феномен, що спостерігається в умовах індукованої центрифугуванням гіпергравітації та космічного польоту, а також при виконанні різних льотних маневрів. Синдром отримав назву індукована гравітацією втрата свідомості (G-induced losses of consciousness). Стан, що передуює втраті свідомості характеризується амнезією, порушенням сенсорних та когнітивних функцій, труднощами в формуванні слів. Вважається, що однією з причин, які призводять до індукованої гравітацією втрати свідомості, є зменшення рівня кисню в мозку [2].

Здається доцільним поділити усі дослідження в області космічної фізіології тварин на два напрямки. До одного належать дослідження впливу гравітації безпосередньо на гравічутливі системи організму, до іншого належать роботи, що вивчають дію неспецифічних стресових факторів, які супроводжують перебування організму в умовах зміненої гравітації. Дослідження останніх років показали, що на клітинному рівні прямий вплив зміненої гравітації проявляється у змінах в цитоскелеті. Структурні елементи цитоскелету – актинові нитки, які в нормі рівномірно заповнюють об'єм клітини, перерозподіляються до периферичних ділянок за умов зміненої гравітації. При цьому спостерігається порушення функціонування рецепторів та іонних каналів.

Одним з найбільш впливових неспецифічних стресових факторів, що здатний спричинити значні порушення функціонування мозку є гіпоксія. Мозок надзвичайно чутливий до надходження кисню. При недостатньому постачанні мозку киснем відбувається порушення ментальних здібностей. На даний момент в галузі космічної нейробіології значна увага приділяється дослідженню цього питання, однак на теперішній час вплив зміненої гравітації на нервову систему досі залишається остаточно не з'ясованим.

Пілотовані позаземні місії, які включають вихід у відкритий космос, вимагають оцінки ризику токсичності планетарного пилу. Було показано, що частинки місячного ґрунту сорбуються на скафандрах і потрапляють всередину космічних кораблів [3,4]. В результаті прямого контакту з частинками

місячного пилу протягом декількох місій Apollo спостерігалось подразнення очей, дихальних шляхів та шкіри. Формування, склад і фізичні властивості місячного пилу (а також марсіанського пилу) та його вплив на здоров'я людини недостатньо охарактеризовані [5], хоча шкідливий вплив його частинок на тканини, що безпосередньо зазнавали дії місячного пилу були описані в літературі [3,6,7]. В організмі ссавців, ультрадисперсні частинки можуть тривалий час зберігатись в носовій порожнині, бронхах та альвеолах за рахунок дифузії, і окрім перерозподілу між різними органами, транспортуються вздовж сенсорних аксонів нюхового нерва до центральної нервової системи [8-11]. Oberdörster і співавт. [10] показали, що інтраназально введені тверді ультрадисперсні частинки (<100 нм) після відкладення на слизовій оболонці носоглотки можуть транспортуватись у центральну нервову систему через нюховий нерв. У щурів, приблизно 20% ультрадисперсних частинок, що осідають на слизовій оболонці, можуть переміщатися до нюхової цибулині мозку. Це може забезпечити шлях надходження ультрадисперсних частинок в ЦНС в обхід гемато-енцефалічного бар'єру [10]. Наночастки  $TiO_2$  були виявлені в мозку 6-тижневих мишей Takeda і співавт. [12] після підшкірного введення їх вагітним самкам. Було показано, що крім головного мозку ультрадисперсні частинки можуть відкладатися у печінці у межах від 4 до 24 годин після контакту [10, 13]. Тверді частинки можуть потрапляти в клітини шляхом ендоцитозу [14, 15]. Однак Geiser і співавт. [16] припустили, що *in vitro* поглинання ультрадисперсних частинок в клітинах не відбувається за жодним з очікуваних типів ендоцитозу, а шляхом дифузії або адгезії. Ці частинки проникають крізь клітинні мембрани без фагоцитозу в легенях і в культурі клітин. У клітинах вони знаходяться у незв'язаній з мембраною формі і можуть безпосередньо взаємодіяти з внутрішньоклітинними білками, органелами, і ДНК, що може значно підвищити їх токсичний потенціал [16].

Нейротоксична дія місячного та марсіанського ґрунту досі не оцінена. Було продемонстровано, що місячний пил, а також тверді наночастинки є причиною запалення [13, 17], яке, як відомо, може змінювати проникність

гемато-енцефалічного бар'єру [18]. Нейротоксична дія місячного та марсіанського пилу може реалізуватись через інгібування синтезу нейромедіатора, зміну потоку іонів через клітинні мембрани, блокування транспорту нейромедіаторів в нервових закінченнях. Основне питання, яке було поставлене в роботі, чи може місячний та марсіанський пил викликати розвиток патогенних процесів, які обумовлюють нейротоксичність? У нашому дослідженні, оцінку нейротоксичних ризиків для здоров'я від впливу симулянтів місячного ґрунту/пилу (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec Орбітальна Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США) та марсіанського ґрунту/пилу (JSC, Mars-1A, ORBITEC Orbital Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США) проводили відповідно до рекомендацій з оцінки ризику нейротоксичності (US Environmental Protection Agency, 1998 року, згідно пункту 3 Оцінка небезпеки: 3.1.2 Дослідження на тваринах; 3.1.2.3 Нейрохімічні наслідки нейротоксичності; 3.1.3.4. *In vitro* дані нейротоксикології). Методологічні підходи передбачали дослідження *in vitro* безпосереднього впливу симулянтів місячного та марсіанського ґрунту на ключові характеристики глутаматергічної нейротрансмісії. Глутамат є основним збуджуючим нейромедіатором в ЦНС ссавців. Передача нервового сигналу ініціюється деполяризацією плазматичної мембрани пресинаптичного нервового закінчення і призводить до вивільнення нейромедіатору шляхом екзоцитозу в синаптичну щілину, його взаємодії з рецепторами постсинаптичної мембрани та активації сигнальних шляхів. У нормі, позаклітинна концентрація глутамату між його квантовим вивільненням зберігається на низькому рівні, тим самим запобігаючи постійній активації рецепторів глутамату і розвитку ексайтотоксичності [19, 20]. В синаптичній щілині відсутні ферменти деградації глутамату і єдиним шляхом для підтримання низької позаклітинної концентрації глутамату, є його транспорт за участі високоафінних  $\text{Na}^+$ -залежних транспортерів глутамату в нейронах і гліальних клітинах. Ці транспортери використовують  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -електрохімічний градієнт на плазматичній мембрані в якості рушійної сили. Зміни в активності

транспортерів глутамату є характерною рисою поширених нейрологічних і нейродегенеративних захворювань, а також супроводжують перебування в умовах зміненою гравітації [21]. Глутаматні транспортери є інтегральними мембранними білками, функції яких тісно пов'язані з плазматичною мембраною а, отже, можуть бути модульовані змінами в її властивостях. Було висловлено припущення, що місячний пил може впливати на плазматичну мембрану завдяки значній реакційній поверхні і пористості.

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 є надзвичайно важливим за умов гіпергравітації оцінити вплив симулянтів місячного та марсіанського пилу на накопичення глутамату нервовими терміналями - ключового процесу, що лежить в основі глутаматергічної нервової передачі.

Дослідження зосереджено на аналізі впливу безпосередньо аналогів місячного та марсіанського пилу та окремо гіпергравітації, а також комбінованого впливу гіпергравітації та аналогів місячного та марсіанського пилу на ключові характеристики глутаматергічної нейротрансмісії: (1) поглинання глутамату нервовими закінченнями головного мозку за участі високоафінних  $\text{Na}^+$ -залежних транспортерів з використанням міченого L- $^{14}\text{C}$ глутамату, (2) мембранний потенціал ( $E_m$ ) плазматичної мембрани нервових закінчень з використанням потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G, та (3) закислення синаптичних везикул нервових терміналей з використанням рН-чутливого флуоресцентного зонду.

## ОСНОВНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 1

#### Матеріали та методи дослідження

##### *Виділення препарату ізольованих нервових закінчень (синапсом) з мозку щурів*

Експерименти на тваринах (щурах-самцях лінії Вістар, 100-120г, з віварію ННЦ «Інститут кардіології імені М.Д. Стражеско» НАМН України) проводились у відповідності до європейських принципів і міжнародного законодавства. Гравітаційне навантаження тварин проводили у спеціальній центрифугі протягом 1 год при 10 g. Після декапітації щурів головний мозок швидко видаляли, відділяли стовбурову частину та мозочок. Великі півкулі мозку повільно гомогенізували у скляному гомогенізаторі Поттера у середовищі виділення (охолоджена льодом 0,32 М сахароза, 5 мМ HEPES-NaOH, рН 7,4, 0,2 мМ EDTA). Всі маніпуляції проводили при 4°C. Синаптосоми отримували після диференційного центрифугування та центрифугування в градієнті щільності фіколу за методом Cotman [22] з невеликими змінами. Всі маніпуляції проводили при 4°C. Препарати синапсом використовувались в експериментах протягом 2 - 4 години після ізоляції. Стандартний сольовий розчин насичувався киснем і містив (у мМ): NaCl-126; KCl-5; MgCl<sub>2</sub>-2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-1,0; HEPES-20; рН 7,4 і D-глюкозу 10. Ca<sup>2+</sup>-вмісне середовище містило додатково 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Концентрацію білка вимірювали згідно Larson і співавт. [23].

##### *Визначення активного накопичення глутамату синаптосомами*

Поглинання L-[<sup>14</sup>C] глутамату синаптосомами вимірювали наступним чином: проби (125 мкл суспензії, 0,2 мг білка/мл) преінкубували в стандартному сольовому розчині при температурі 37°C протягом 10 хв. Поглинання ініціювали додаванням 10 мкМ L-глутамату (з 420 нМ L-[<sup>14</sup>C]

глутамату (0.1 мКі/мл), інкубували протягом різних часових інтервалів (1, 2, 10 хв.) при температурі 37°C, та швидко осаджували на мікроцентрифузі (20 с при 10000 g). Для оцінки неспецифічного зв'язування, описані вище процедури були виконані в середовищі, де Na<sup>+</sup> був заміщений на органічний катіон NMDG. Поглинання та зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату визначали як зниження радіоактивності в аліквотах супернатанту (100 мкл) і збільшення радіоактивності осаду та вимірювали шляхом сцинтиляційного рахунку з сцинтиляційною рідиною ACS (1,5 мл).

***Реєстрація змін потенціалу плазматичної мембрани (E<sub>m</sub>) методом спектрофлуориметрії***

Реєстрацію змін мембранного потенціалу проводили на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія), з використанням позитивно зарядженого потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G. Флуоресценцію реєстрували в кварцовій кюветі з постійним перемішуванням, на довжині хвилі збудження та емісії 528 та 551 нм, відповідно (спектральна ширина щілин по 5 нм). Перед додаванням флуоресцентного зонду синаптосоми преінкубували при 37°C 5 хв.

Родамін 6G (кінцева концентрація 0,5 мкМ) додавали до суспензії синаптосом (кінцева концентрація білка 0,5 мг/мл) та реєстрували кінетику накопичення зонду до досягнення платового рівня флуоресценції. Щоб оцінити зміни потенціалу плазматичної мембрани був введений індекс мембранного потенціалу (відношення  $F$ ):

$$F = F_t / F_0$$

де  $F_0$  та  $F_t$  – інтенсивності флуоресценції родаміну 6G відповідно за відсутності та в присутності синаптосом.

***Визначення рівня закислення синаптичних везикул***

Для дослідження закислення синаптичних везикул був використаний рН-чутливий флуоресцентний барвник акридиновий оранжевий (АО) (Molecular Probes, США), який селективно накопичується у компартментах з кислим рН (зокрема в синаптичних везикулах). АО - це ліпофільний амін; непротонована форма якого вільно проникає в мембрану. Він стає мембрано-непроникним після протонування в кислому середовищі органел, що мають всередині позитивний заряд. Розподіл АО в синаптосомх залежить від рН. Таким чином, флуоресценція АО, акумульованого в органелах, пропорційна рН у середовищі органели і може свідчити про рушійну силу для наповнення синаптичних везикул нейромедіатором. Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 (Японія). При цьому довжина хвилі збудження становила 490 нм, а емісії - 530 нм (спектральна ширина щілини - 5 нм). Накопичення АО синаптосомами реєстрували після додавання АО (кінцева концентрація 5 мкМ) до суспензії синаптосом (кінцева концентрація білка 0,2 мг/мл), при постійному перемішуванні та після преінкубації синаптосомальної суспензії протягом 10 хв. при 37°C. Закислення синаптичних везикул в синаптосомах визначали за інтенсивністю флуоресценції АО згідно формули:

$$F = F_t / F_0$$

де  $F_0$  – інтенсивність флуоресценції АО за відсутності синаптосом у кюветі,  $F_t$  – інтенсивність флуоресценції АО у присутності синаптосом у кюветі.

***Аналіз середнього діаметру частинок у препаратах тромбоцитів методом проточної цитометрії***

Аналіз середнього діаметру частинок у препаратах тромбоцитів проводили на проточному цитометрі COULTER EPICS XL Flow Cytometer. Тромбоцити (~0,2 мг/мл) суспендовали в стандартному буфері, який мистів в



мМ: NaCl-126,0, KCl-5,0, MgCl<sub>2</sub>-1,4, NaH<sub>2</sub>PO-1,0, HEPES-20,0, рН 7,4, ЭГТА-2,0, D-глюкозу-10,0 та інкубували при 30<sup>0</sup> С впродовж 10 хв перед вимірюванням.

### ***Аналіз препаратів синаптосом та симулянтів місячного та марсіанського ґрунту за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії***

Розмір частинок симулянтів місячного та марсіанського ґрунту, а також синаптосом оцінювали на лазерному кореляційному спектрометрі "Zetasizer-3" (Malvern Instrument, UK), який оснащений гелій-неоновим лазером LGN-111 (P = 25 мВт, λ= 633 нм). Діапазон приладу складає від 1 нм до 50 мкм. 1 мл суспензії синаптосом або симулянту в циліндричній кварцовій кюветі, 10 мм в діаметрі, знаходиться в лунці спектрометру з підтриманням постійної температури. Реєстрація та обробка сигналу від динамічно розсіяного світла (під кутом 90°) від суспензії частинок, виконується протягом 120 с при +22°С. Результати вимірювань обробляються за допомогою комп'ютерною програмою PCS-Size mode v1.61. Спектрометр обладнаний корелятором типу 7032 CE.

### ***Статистична обробка результатів***

Результати представлені як середнє ± S.E.M. в n незалежних експериментах. Різниця між двома групами порівнювали за допомогою двостороннього тесту Стьюдента. Різниця вважалася значущою при P ≤ 0,05.

### ***Матеріали***

Симулянти місячного та марсіанського ґрунту JSC-1a та JSC, відповідно (Orbitec, Orbital Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США); EGTA, HEPES, NMDG були придбані у Sigma (США). Ficoll 400, L-[<sup>14</sup>C]глутамат, сцинтиляційна рідина ACS (Amersham, Великобританія). Акридиновий оранжевий і родамін 6G (Molecular Probes, США).

## РОЗДІЛ 2

### Результати досліджень

#### **2.1. Аналіз біомодулюючих властивостей та токсичної дії аналогів місячного та марсіанського ґрунту/пилу за умов незміненої гравітації**

##### *2.1.1 Аналіз симулянтів місячного та марсіанського пилу та синапсом за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії*

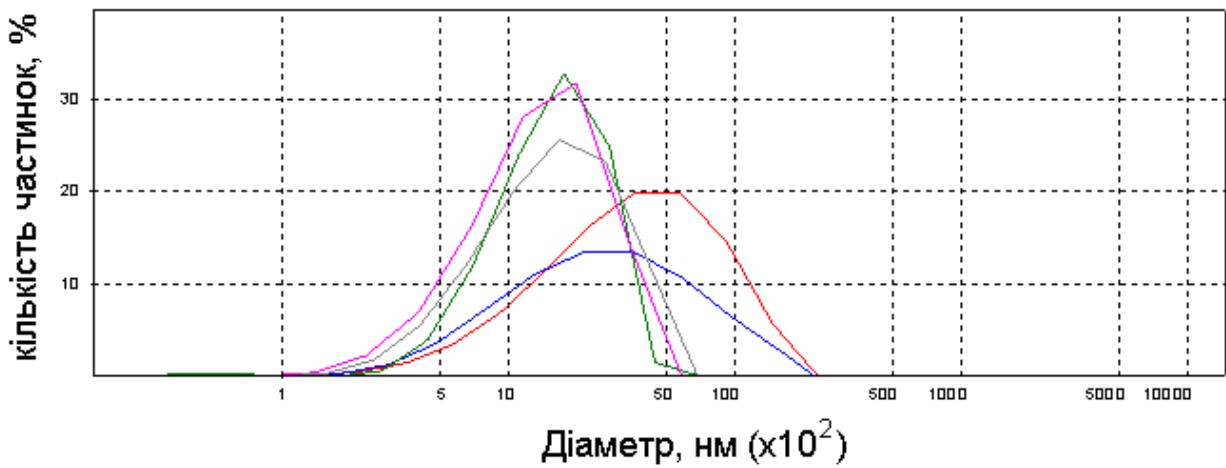
Середній розмір частинок у суспензії симулянтів ґрунту в стандартному сольовому розчині був розрахований на основі 5 вимірювань, кожне протягом 1 хв. і становив  $2500 \pm 336$  нм для частинок симулянта місячного пилу (рис. 1) і  $5300 \pm 1440$  нм для симулянта марсіанського пилу (рис. 2). Крім того, в препаратах симулянтів була виявлена фракція частинок з малим розміром ( $\sim 50$ - $60$  нм) (рис. 1Б, 2Б).

Для більш детального аналізу, симулянти піддавались обробці ультразвуком при 22 кГц протягом 1 хв., після чого розмір частинок знижувався більш ніж в два рази для симулянта місячного пилу і складав  $1110 \pm 67$  нм (рис. 1В; рис. 3), тоді як для симулянта марсіанського пилу зниження розміру становило 16%, що склало  $\sim 4449 \pm 1030$  нм (рис. 2В; рис. 3). На рис. 1Г та 2Г показана фракція частинок з розміром  $\sim 50$ - $60$  нм у оброблених ультразвуком зразках симулянтів.

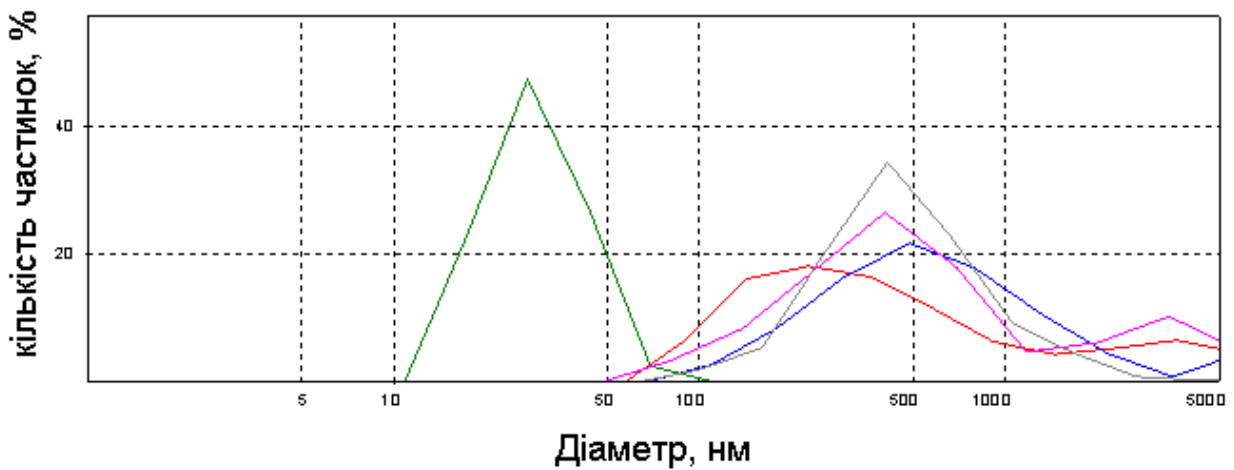
В експериментах використовувались ізольовані нервові закінчення (синаптосоми) мозку щурів (див. Матеріали і методи), які зберігають всі характеристики інтактного нервового закінчення, тобто здатність до підтримання мембранного потенціалу, накопичення глутамату, екзоцитозу і т.д. Розмір синапсом, виміряний за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії становив  $3,24 \pm 0,10$  мкм (рис. 4). Таким чином, симулянти

місячного та марсіанського ґрунту містяться частинки, розмір яких був у тому ж діапазоні та нижче, ніж розмір нервових закінчень, що обумовлює можливість їх взаємодії з плазматичною мембраною синапсом та впливу на функціонування мембранних білків.

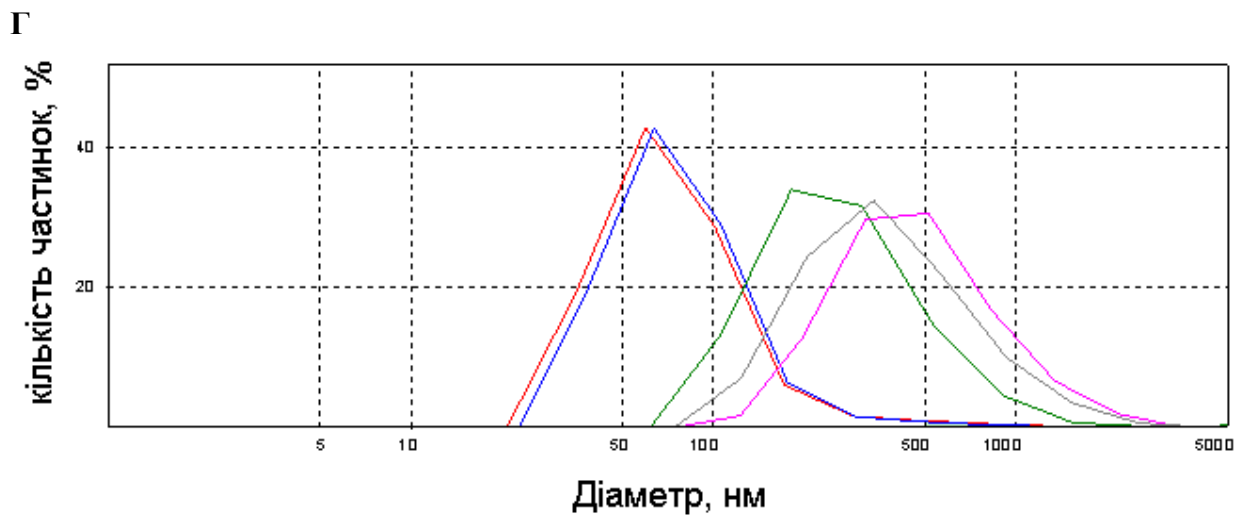
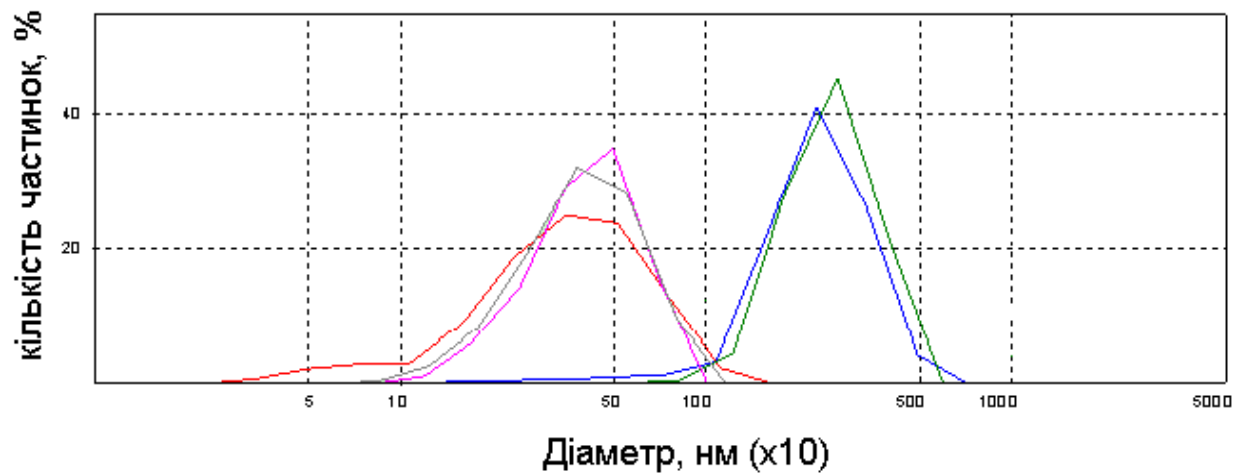
**А**



**Б**

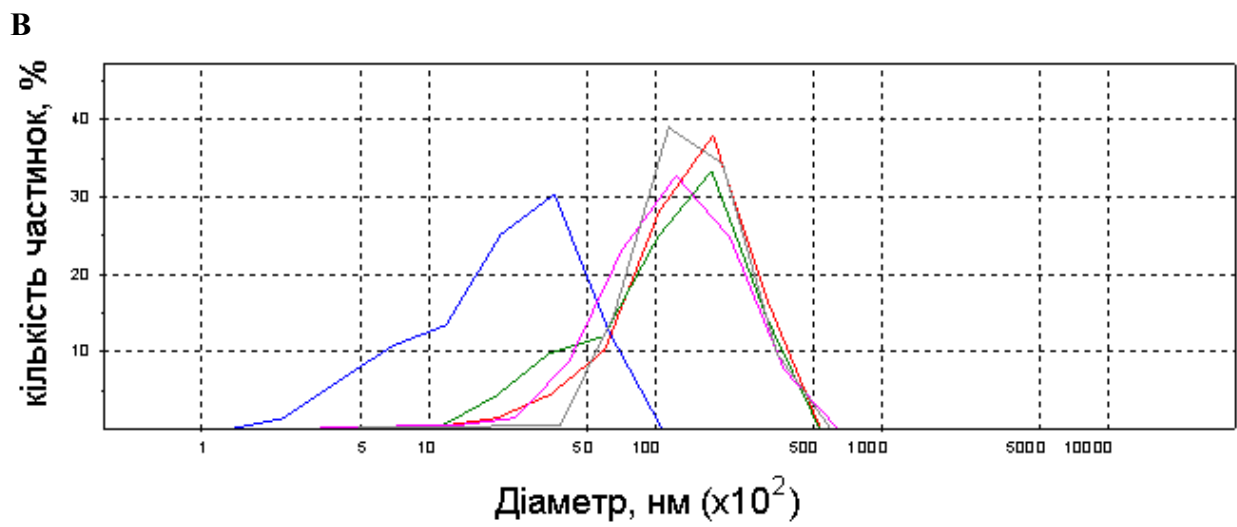
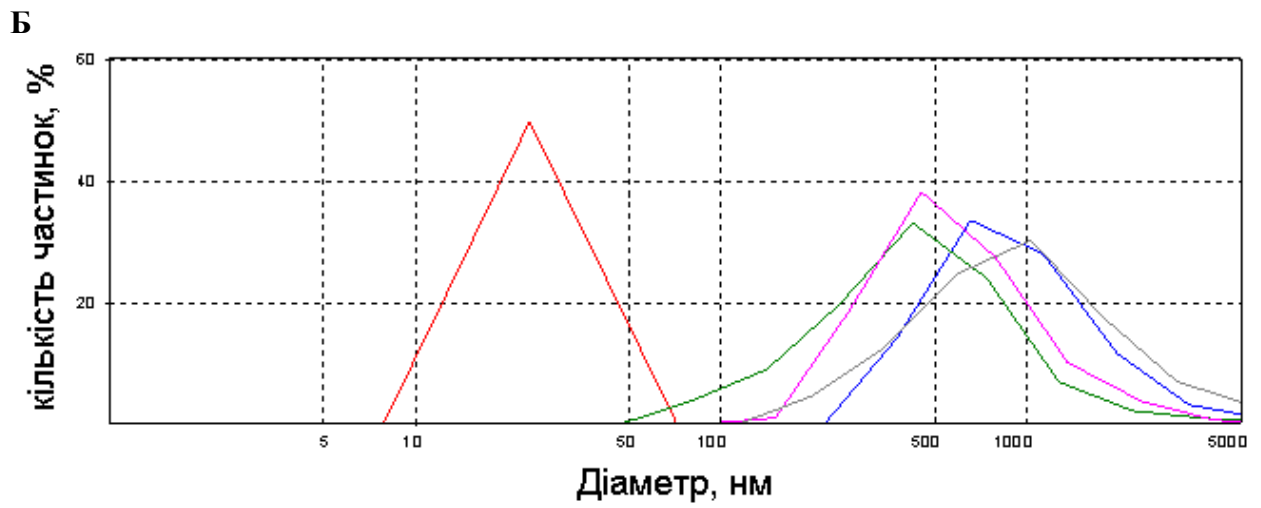
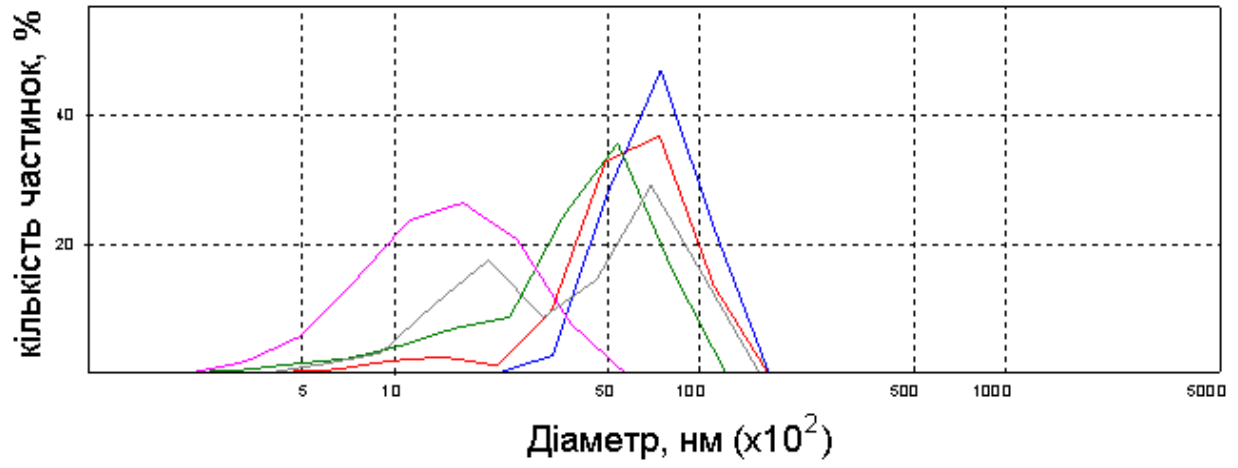


**В**

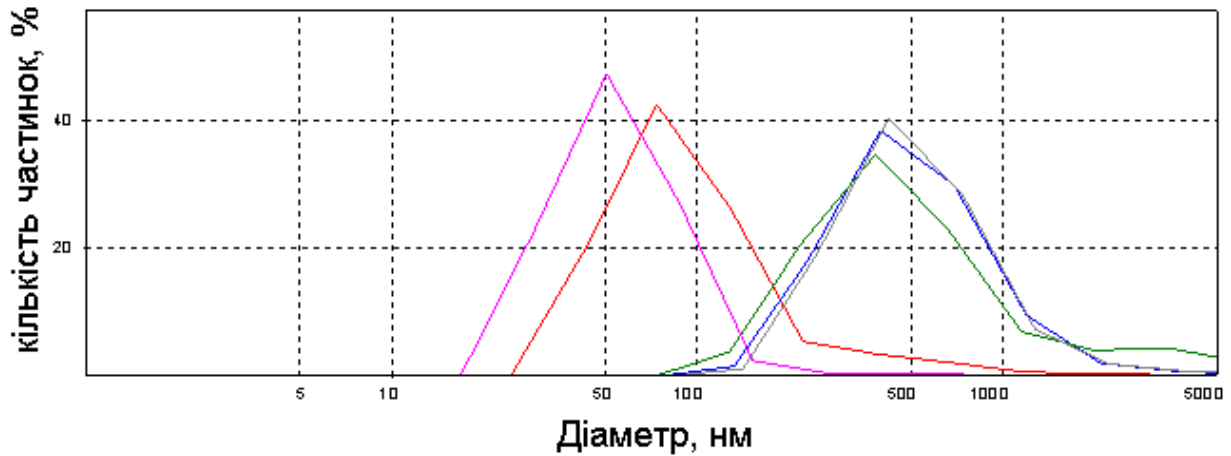


**Рис. 1.** Аналіз розміру частинок суспензії симулянта місячного пилу (2 мг/мл) в стандартному сольовому розчині (на основі 5 вимірювань по 1хв.) методом фотонної кореляційної спектроскопії: 1 вимірювання – червоний колір, 2 - синій, 3 - зелений, 4 - сірий, 5 – рожевий. А – суспензія симулянта місячного ґрунту до (А) та після обробки (В) ультразвуком (22 кГц 1 хв.); Б – фракція частинок з малим діаметром у суспензії симулянта до (Б) та після обробки (Г) ультразвуком.

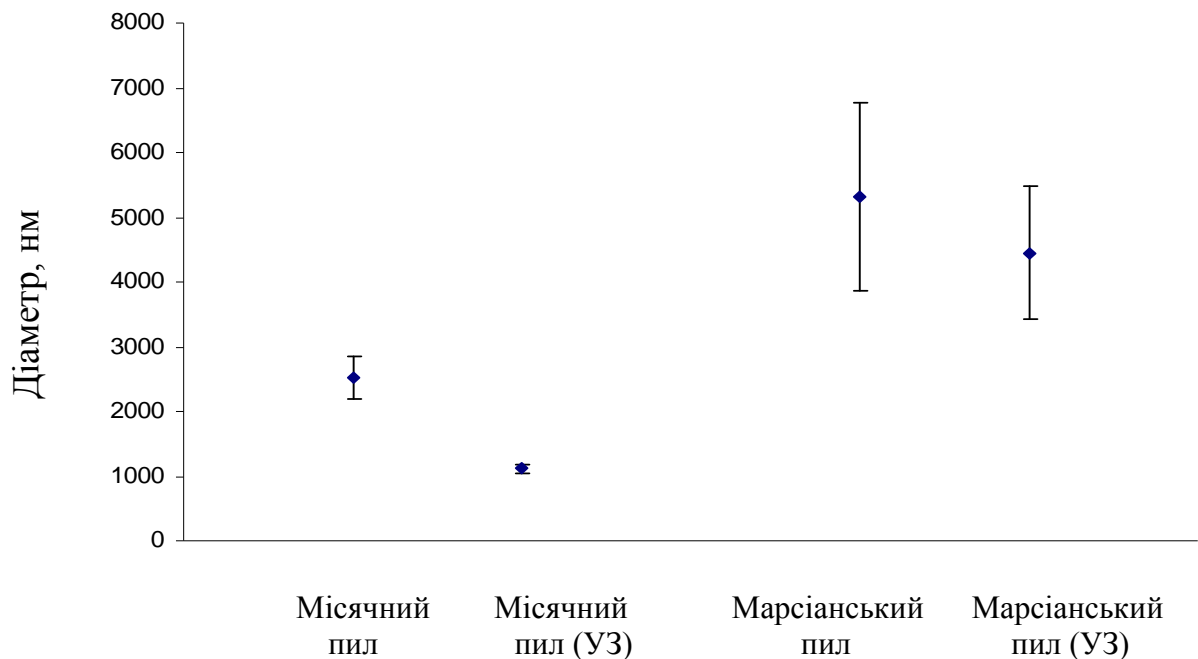
А



**Г**

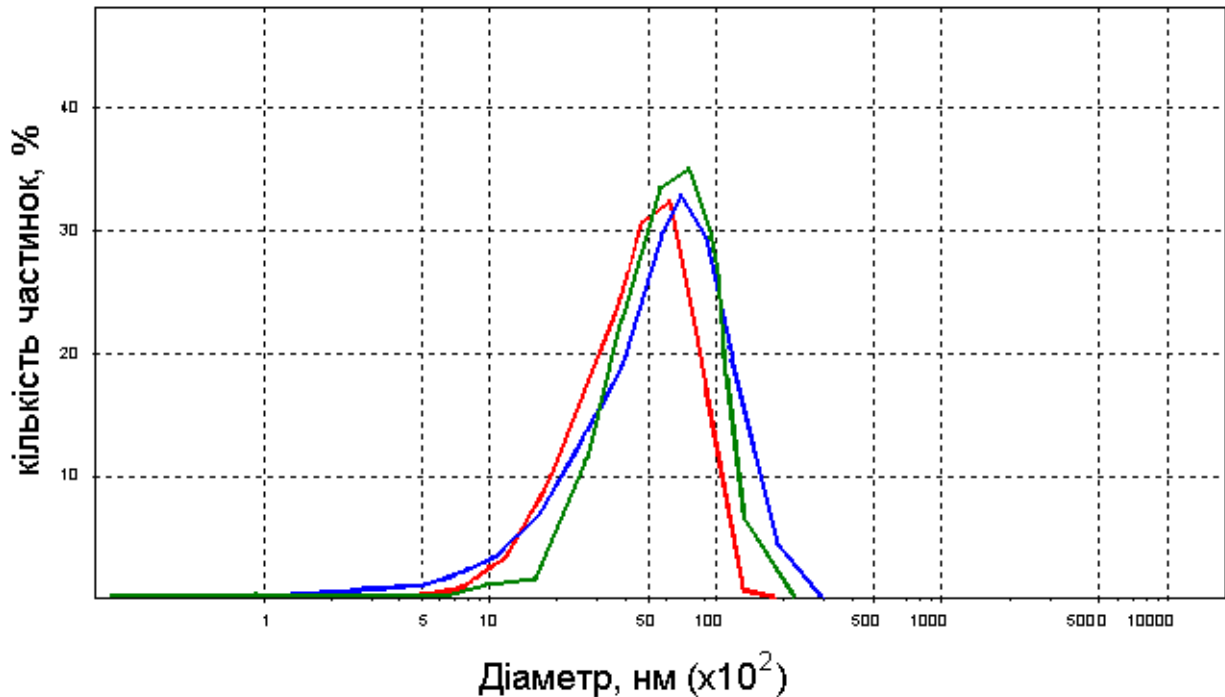


**Рис. 2.** Аналіз розміру частинок суспензії симулянта марсіанського пилу (2 мг/мл) в стандартному сольовому розчині (на основі 5 вимірювань по 1хв.) методом фотонної кореляційної спектроскопії: 1 вимірювання – червоний колір, 2 - синій, 3 - зелений, 4 - сірий, 5 – рожевий. А – суспензія симулянта марсіанського пилу до (А) та після обробки (В) ультразвуком (22 кГц 1 хв.); Б – фракція частинок з малим діаметром у суспензії симулянта до (Б) та після обробки (Г) ультразвуком.



**Рис. 3.** Вплив обробки ультразвуком на середній діаметр частинок симулянтів місячного та марсіанського пилу. Після обробки суспензій симулянтів (2 мг/мл)

ультразвуком ( 22 кГц 1 хв.) середній діаметр визначали на основі 5 вимірювань по 1хв.



**Рис. 4.** Аналіз розміру синапсом (0,2 мг/мл) у стандартному сольовому розчині методом фотонної кореляційної спектроскопії. Середній розмір визначали на основі 3 вимірювань по 2хв. 1 вимірювання – червоний колір, 2 - синій, 3 – зелений.

### ***2.1.2 Оцінка зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з симулянтами місячного та марсіанського ґрунту***

Перед початком експериментів з накопиченням L-[<sup>14</sup>C]глутамату ми проаналізували чи може L-[<sup>14</sup>C]глутамат сорбуватись на поверхні симулянтів ґрунту. Це важливо оскільки зниження концентрації L-[<sup>14</sup>C]глутамату в інкубаційному середовищі за рахунок сорбції може вплинути на точність визначення початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсомами. Враховуючи наші дані про розмір частинок симулянтів місячного та марсіанського ґрунту (рис.1-3), ми використовували фільтр

Millipore (0,45 мкм) для їх відокремлення. У експериментах симулянти ґрунту інкубували з 10 мкМ L-[<sup>14</sup>C]глутамату в стандартному сольовому розчині протягом 10 хв., а потім фільтрували через фільтр і промивали 3 мл стандартного сольового розчину. Було виявлено, що радіоактивність на фільтрах в присутності та за відсутності симулянтів була однаковою, отже симулянти не сорбують L-[<sup>14</sup>C]глутамату на своїй поверхні. Таким чином, наявність симулянтів пилу не змінює концентрацію L-[<sup>14</sup>C]глутамату в середовищі інкубації.

### ***2.1.3 Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсами в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу***

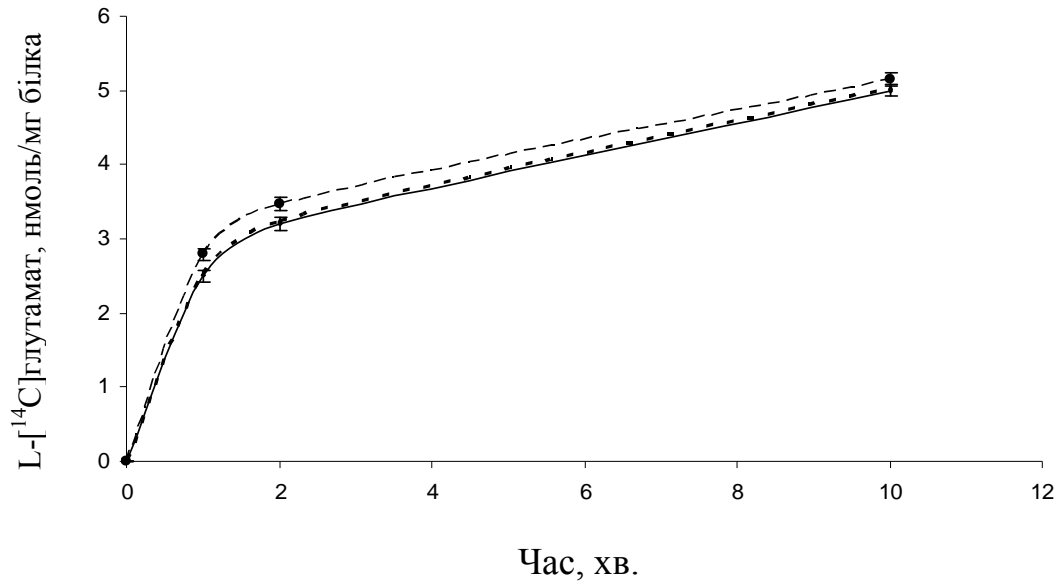
Було показано (рис. 5), що в присутності симулянтів ґрунту збільшувалась початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) приблизно на 10%, що склало до  $2,5 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в контрольних синапсах і  $2,79 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в синапсах в присутності симулянту місячного ґрунту ( $P \leq 0,05$ , t-тест Стюдента,  $n = 6$ ) (рис. 5). Водночас, в присутності симулянту марсіанського ґрунту початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) істотно не змінювалась і складала  $2,59 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка. Таким чином, саме симулянт місячного ґрунту, впливає на накопичення глутамату.

Оксид заліза є одним з основних компонентів місячного та марсіанського ґрунту. Тому ми використовували синтетичні наночастинки магнетиту в якості додаткового контролю. Було показано, що синтетичні наночастинки не впливають на початкову швидкість поглинання L-[<sup>14</sup>C]глутамату в ізольованих нервових закінченнях. Таким чином, здатність змінювати поглинання глутамату є особливістю, що притаманна тільки симулянту місячного ґрунту.

Існує кілька основних факторів, які можуть впливати на початкову швидкість поглинання L-[<sup>14</sup>C]глутамату в синапсах: (\*) зміна мембранного потенціалу, оскільки він є рушійною силою для активного транспорту глутамату (\*\*) зміни протонного градієнта синаптичних везикул, який є



рушійною силою для акумуляції глутамату всередині, або (\*\*\*) зміни неспецифічного зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату на синаптосомах.

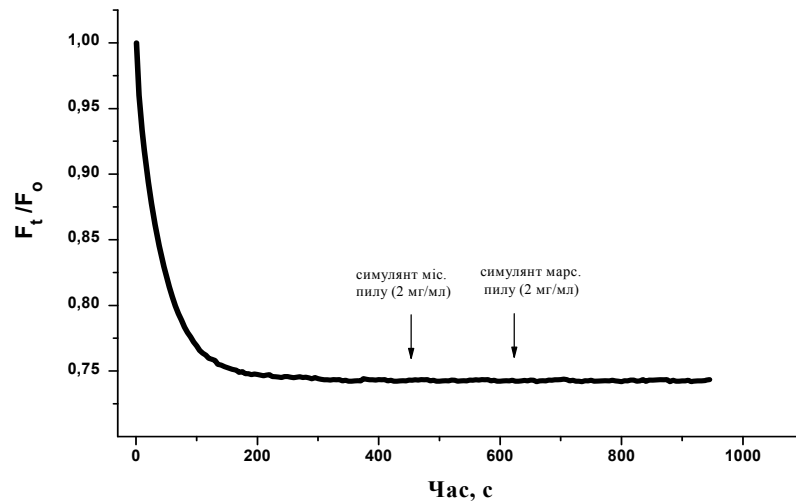


**Рис. 5.** Активне накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами у часі за відсутності (суцільна лінія) та в присутності (пунктирна лінія) симулянта місячного ґрунту (2 мг/мл). Накопичення ініціювали внесенням 10 мкМ глутамату (з 420 нМ L-[<sup>14</sup>C]глутамату) (0.1 μCi/ml) до суснезії синаптосом (0,2 мг/мл білка). Проби інкубували при 37°C протягом 1, 2 та 10 хв., та швидко осаджували. Результати представлені як середнє значення ± SEM на основі 6 незалежних експериментів.

#### ***2.1.4 Мембранний потенціал нервових закінчень у присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту***

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-електрохімічний градієнт плазматичної мембрани є рушійною силою для транспортер-залежного накопичення глутамату, а зміни мембранного потенціалу можуть змінювати початкову швидкість цього процесу [19, 20, 24, 25, 26]. Деполяризація плазмалеми в присутності 35 мМ KCl призводить до зниження початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату.

Як показано на рисунку 6, в присутності синаптосом спостерігається зниження інтенсивності флуоресценції родаміну 6G внаслідок його акумуляції на внутрішньому боці плазматичної мембрани та гасіння. Індекс мембранного потенціалу досягав плато за 3 хв. В присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту не спостерігається подальшого зростання флуоресценції зонда, що вказує на відсутність деполяризації плазматичної мембрани ізольованих нервових закінчень. Ми також використовували синтезовані наночастинки магнетиту в якості додаткового контролю і не виявили зміни мембранного потенціалу синаптосом у їх присутності.



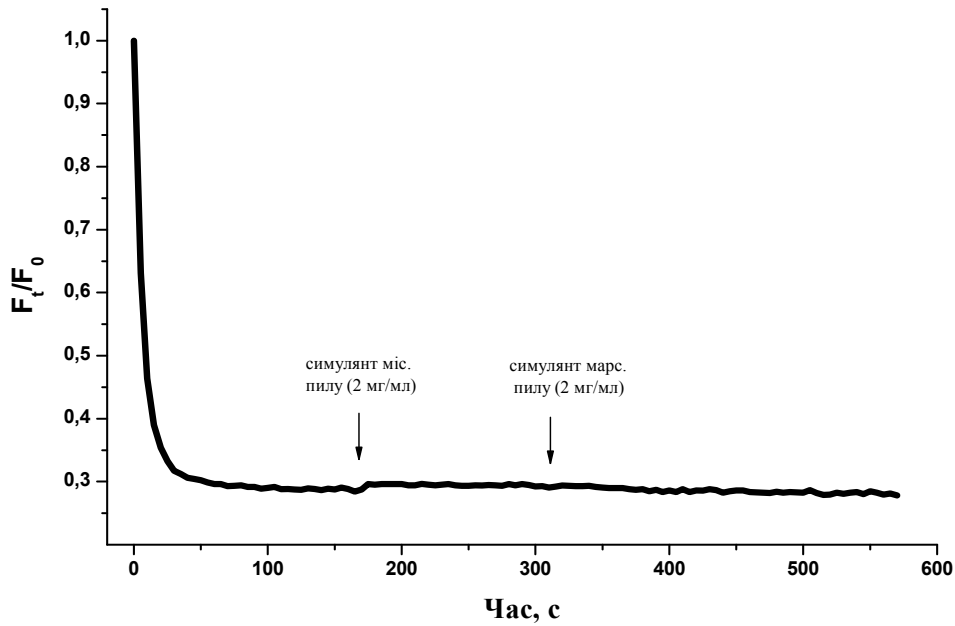
**Рис. 6.** Оцінка мембранного потенціалу синаптосом в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту. Симулянти вносили після досягнення плато флуоресценції потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G. Графік відображає результати 4 незалежних експериментів.

Крім експериментів з ізольованими нервовими терміналами був проаналізований мембранний потенціал тромбоцитів в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту. Не було зафіксовано зростання флуоресценції потенціал-чутливого зонду родаміну 6G, що вказує на відсутність деполяризації плазматичної мембрани тромбоцитів.

### *2.1.5 Протонний градієнт синаптичних везикул в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту*

З цитозолу нервових закінчень глутамат накопичується в синаптичних везикулах за рахунок роботи везикулярних транспортерів глутамату, які використовують електрохімічний протонний градієнт як рушійну силу для транспорту. Таким чином, транспорт глутамату через транспортери плазматичної мембрани опосередковано залежить від протонного градієнта синаптичних везикул. Ми показали, що бафіломіцин А1, специфічний інгібітор протонної V-АТФази, значно знижує рівень акумульованого в синапсосомах глутамату. З використанням рН-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого було проаналізовано протонний градієнт синаптичних везикул як компонент електрохімічного градієнта  $\Delta\mu_{H^+}$ . Як показано на рисунку 7, після додавання зонда до суспензії синапсосом спостерігається часткове гасіння флуоресценції за рахунок накопичення акридинового оранжевого в синаптичних везикулах. Після цього до суспензії додавали симулянти місячного або марсіанського ґрунту. Ми не зареєстрували істотних змін інтенсивності флуоресценції акридинового оранжевого у відповідь на додавання симулянтів ґрунту, що свідчить про те, що синаптичні везикули зберігають здатність до підтримання протонного градієнта в присутності вказаних симулянтів.

Таким чином, ми прийшли до висновку, що ні зміни мембранного потенціалу, ні зміни закислення синаптичних везикул не є причиною збільшення початкової швидкості накопичення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту. У експериментах були також використані синтезовані наночастинки магнетиту в якості додаткового контролю, проте ці наночастинки також не викликають змін протонного градієнта синаптичних везикул в нервових закінченнях.



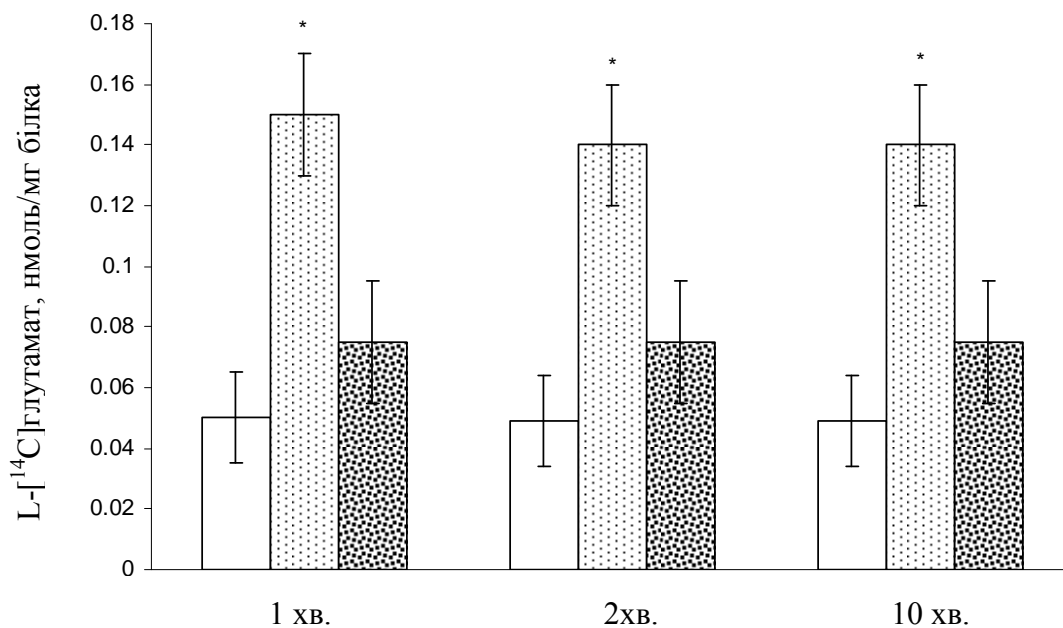
**Рис. 7.** Оцінка протонного градієнта синаптичних везикул в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту. Симулянти вносили після досягнення платоного рівня флуоресценції рН-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого. Графік відображає результати 4 незалежних експериментів.

Крім експериментів з ізольованими нервовими терміналями було проаналізовано закислення секреторних гранул тромбоцитів в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту. Не було зафіксовано зростання флуоресценції рН-чутливого зонду акридинового оранжевого, що вказує на відсутність дисипації протонного градієнту секреторних гранул тромбоцитів.

### ***2.1.6 Зв'язування $L$ - $[^{14}C]$ глутамату з ізольованими нервовими закінченнями в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу***

Оскільки  $Na^+/K^+$ -електрохімічний градієнт є рушійною силою для активного транспорту глутамату, заміщення позаклітинного  $Na^+$  пригнічує роботу транспортерів глутамату і дозволяє оцінити зв'язування  $L$ - $[^{14}C]$ глутамату з плазматичною мембраною синаптосом. Слід зазначити, що стандартний сольовий розчин містить 126 мМ  $Na^+$  (див. Матеріали та методи).

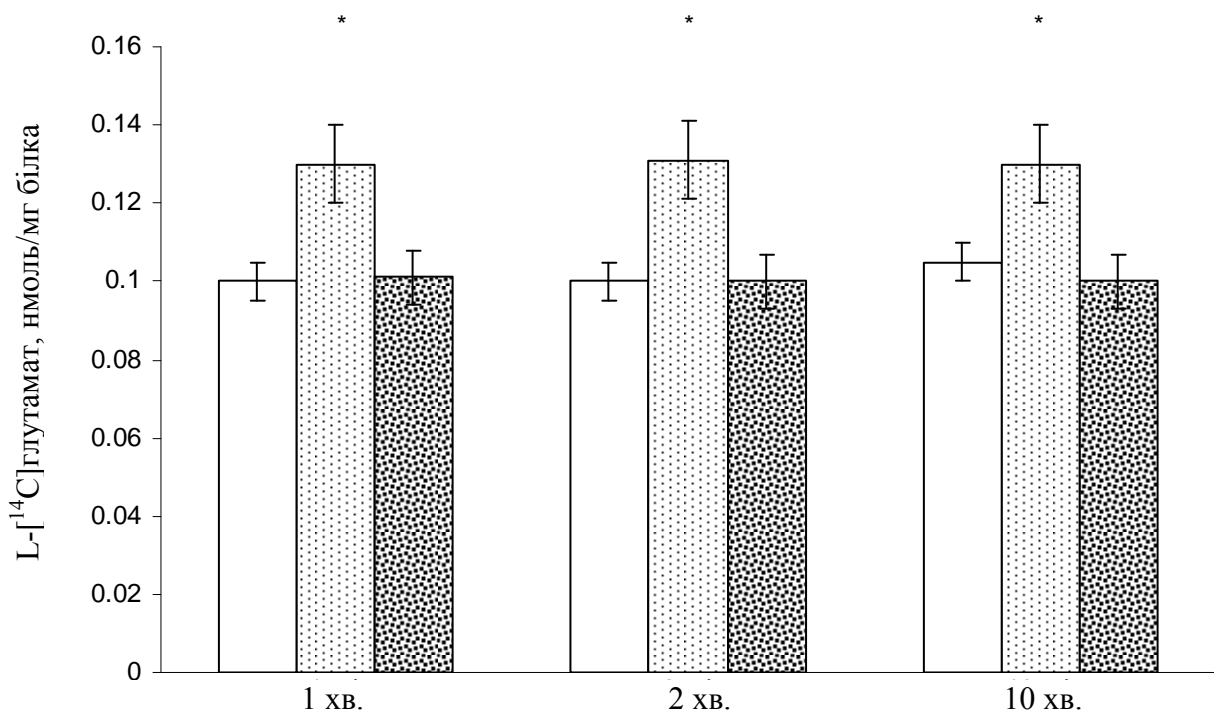
Позаклітинний  $\text{Na}^+$  був повністю замінений одновалентним органічним катіоном N-метил-D-глюкаміном (NMDG) і з'ясувалось, що в присутності симулянту місячного ґрунту зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глютамату (10 мкМ) з синаптосомами за 1 хв. зросло з  $0,05 \pm 0,015$  нмоль/мг білка в контролі до  $0,15 \pm 0,02$  нмоль/мг білка в присутності симулянта місячного ґрунту ( $P \leq 0,05$ , t-тест Ст'юдента,  $n=6$ ) (рис. 8). Симулянт марсіанського ґрунту подібного ефекту не мав: в його присутності зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глютамату з синаптосомами становило  $0,075 \pm 0,02$  нмоль/мг білка (рис. 8). Синтезовані наночастинки магнетиту, які були використані в якості додаткового контролю також не впливали на зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глютамату з ізольованими нервовими закінченнями.



**Рис. 8.** Зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глютамату з синаптосомами в середовищі з низькою концентрацією  $\text{Na}^+$  за відсутності (прозорий стовпчик) та в присутності симулянтів місячного (другий стовпчик) та марсіанського (третій стовпчик) ґрунту (2 мг/мл). \*,  $P \leq 0,05$  в порівнянні з контролем.

### 2.1.7 Зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервовими закінченнями в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту в умовах низьких температур

Багато властивостей біологічних мембран, сильно залежать від температури: підвищення температури підвищує плинність мембран, при певних температурах відбуваються фазові переходи у ліпідному бішарі, змінюється проникність та товщина мембрани. Як показано на рисунку 9 зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсосомами за відсутності та в присутності симулянту місячного ґрунту при низькій температурі (+4°C) збільшувалось з  $0,100 \pm 0,005$  нмоль/мг білка в контролі до  $0,13 \pm 0,01$  нмоль/мг білка в присутності симулянту за 1 хв. Аналіз зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсосомами в присутності симулянта марсіанського ґрунту або наночастинок магнетиту показало, що воно змінювалось незначно в порівнянні з контролем. Таким чином, ці дані по зв'язуванню L-[<sup>14</sup>C]глутамату узгоджуються з вищенаведеними результатами, одержаними у середовищі з низькою концентрацією Na<sup>+</sup>.



**Рис. 9.** Зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синаптосомами за низької температури (+4°C) за відсутності (прозорий стовпчик) та в присутності симулянтів місячного (другий стовпчик) та марсіанського (третій стовпчик) ґрунту (2 мг/мл). \*, P≤0.05 в порівнянні з контролем.

### ***2.1.8 Модуляція фізико-хімічних параметрів плазматичної мембрани клітин для аналізу можливості зниження шкідливого впливу наночастинок***

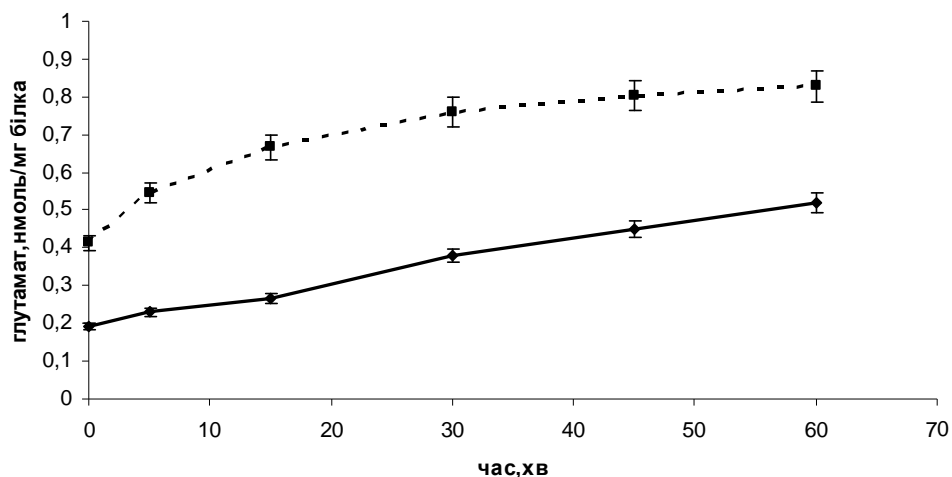
Для аналізу можливості зниження шкідливого впливу наночастинок за умов модуляції фізико-хімічних параметрів плазматичної мембрани клітин нами були проведені додаткові експерименти з використанням акцептору холестеролу метил-бета-циклодекстрину (МЦД), метильованого циклічного олігосахариду (з семи залишків β(1-4)-глюкопіранози), який може утворювати водорозчинний комплекс з холестеролом. При контакті з біологічними мембранами МЦД видаляє з них холестерол. Було досліджено позаклітинний рівень та витікання L-[<sup>14</sup>C]глутамату з холестерол-дефіцитних синаптосом за умов зниження температури.

Температура в значній мірі впливає на властивості біологічних мембран, а саме впорядкованість, фазовий перехід, проникність та товщину. Оскільки холестерол впливає на фізико-хімічні властивості мембрани, він може бути використаний для того, щоб мінімізувати ефект температури на структуру та функції мембрани. Тому у даному розділі ми проаналізували, чи впливає зміна вмісту холестеролу в нервових терміналях на їх проникність щодо L-[<sup>14</sup>C]глутамату.

Позаклітинний рівень та витікання L-[<sup>14</sup>C]глутамату з контрольних синаптосом та синаптосом зі зниженим вмістом холестеролу було визначено при температурі +4°C. Контрольні та холестерол-дефіцитні синаптосоми (після обробки 15 мМ МЦД з подальшим видаленням акцептора з середовища інкубації) завантажували L-[<sup>14</sup>C]глутаматом при +37°C (див. Матеріали та методи), а потім охолоджували до +4°C. Показано, що позаклітинний рівень L-

[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату в синапсосомах при  $+4^\circ\text{C}$  становив  $0,193 \pm 0,013$  нмоль/мг білка у контролі та  $0,410 \pm 0,015$  нмоль/мг білка після видалення холестеролу 15 мМ МЦД ( $P \leq 0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента,  $n=5$ ) (рис. 10, А). Впродовж перших 15 хв. інкубації при  $+4^\circ\text{C}$  витікання L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з холестерол-дефіцитних синапсосом було у три рази вище ніж з контрольних синапсосом і становило  $5,0 \pm 2,0$  % загального вмісту мітки в контролі та  $15,7 \pm 3,0$  % загального вмісту мітки за умов дефіциту холестеролу ( $P \leq 0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента,  $n=5$ ) (рис. 10, Б). При подальшій інкубації синапсосом впродовж 60 хв. при  $+4^\circ\text{C}$  різниця у витіканні L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату між контрольними та холестерол-дефіцитними синапсосомами ставала меншою, однак позаклітинний рівень L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату в синапсосомах зі зниженим вмістом холестеролу був значно вище, ніж у контролі. Порівняльний аналіз позаклітинного рівня та нестимульованого вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату при  $+4^\circ\text{C}$  показав відсутність різниці між контрольними синапсосомами та синапсосомами, обробленими «нейтральним» комплексом МЦД-холестерол (1:0,15) впродовж 35 хв. з подальшим видаленням цього комплексу.

А



Б



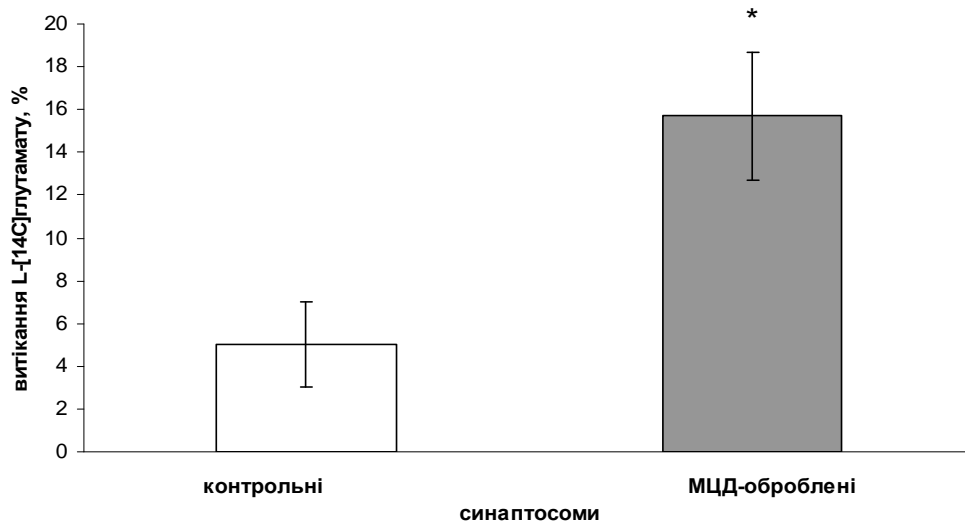


Рис. 10. А-Позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату в нервових терміналях при +4°C в контролі (суцільна лінія) та після видалення холестеролу 15 мМ МЦД (пунктирна лінія). Б-Витікання L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервових терміналей при +4°C в контролі (прозорий стовпчик) та після видалення холестеролу 15 мМ МЦД (сірий стовпчик). При побудові графіків було використано дані, одержані при аналізі 5 препаратів синаптосом, кожен експеримент був проведений в трьох паралелях. \*,  $P \leq 0,05$  у порівнянні з контролем,  $t$ -тест Ст'юдента.

У наступній серії експериментів ми нагрівали синаптосоми до +37°C та визначали в них позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату. Різниця у цьому параметрі між контрольними та холестерол-дефіцитними синаптосомами зменшувалась та становила  $0,193 \pm 0,013$  нмоль/мг білка у контролі та  $0,282 \pm 0,013$  нмоль/мг білка після видалення холестеролу 15 мМ МЦД ( $P \leq 0,05$ ,  $t$ -тест Ст'юдента,  $n=5$ ). Таким чином ефект видалення холестеролу на позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату був односпрямованим при +4 °C та +37°C.

У синаптосомах при +4 °C та +37 °C механізми нестимульованого вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату є різними. При охолодженні синаптосом до +4°C знижується ефективність майже усіх процесів крім трансмембранної дифузії, які забезпечують нестимульоване вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату.

Таким чином при низькій температурі (+4°C) проникність мембрани синаптосом до L-[<sup>14</sup>C]глутамату була вище після видалення холестеролу.

Модуляція рівня холестеролу впливала на температуро-залежні зміни властивостей мембрани синапсом.

У наступній серії експериментів нами була проведена оцінка можливості нейропротекції за рахунок зниження вмісту мембранного холестеролу у нервових терміналях

Продемонстровано, що часткове видалення холестеролу з синапсом знижує транспортер-залежне вивільнення глутамату: 1) стимульоване деполяризацією плазматичної мембрани, 2) шляхом гетерообміну, 3) за низької концентрації  $\text{Na}^+$ , 4) при дисипації протонного градієнту синаптичних везикул. Беручи до уваги, що транспортер-залежне вивільнення глутамату з нервових терміналей є основним механізмом вивільнення глутамату при церебральній гіпоксії, ішемії, інсульті, черепно-мозковій травмі та інших порушеннях, очевидно, що його зниження як результат екстракції холестеролу має потенціал щодо запобігання пошкодження головного мозку при вищезазначених патологічних станах.

Приймаючи до уваги вищевикладене, можна заключити, що подальше вивчення дії симулянтів місячного та марсіанського ґрунту за умов модуляції фізико-хімічних параметрів, зокрема за умов зниження вмісту холестеролу плазматичної мембрани, є надзвичайно важливим для аналізу можливості зниження шкідливого впливу цих наночастинок.

## **2.2. Аналіз біомодуючих властивостей та токсичної дії аналогів місячного та марсіанського ґрунту/пилу за умов гіпергравітації**

### ***2.2.1 Характеристика препарату синаптосом, одержаних від контрольних тварин та тварин, що зазнали гравітаційного навантаження***

На теперішній час накопичено значну кількість даних про морфологічні зміни в нервовій системі під впливом зміненої гравітації. Тому вивчення функціонування нервової системи за цих умов є надзвичайно актуальним. Для дослідження процесу нейросекреції використовуються синаптосоми – відділені від аксонів нервові терміналі. Тому першочерговим завданням цієї роботи була оцінка змін основних характеристик, які лежать в основі нейросекреції, в синаптосомах одержаних від тварин, що зазнали впливу гіпергравітаційного навантаження. Найбільш зручним методом для порівняльного аналізу морфофункціонального стану синаптосом є цитофлуориметрія. Однак цей метод обмежується розмірами досліджуваних клітин.

#### ***2.2.1.1. Характеристика препарату синаптосом, отриманих з тварин після гіпергравітаційного навантаження, методом лазерної кореляційної спектроскопії***

Методом лазерної кореляційної спектроскопії було проведено визначення середнього діаметру та функції розподілу за розміром ізольованих нервових терміналей до та після гравітаційного навантаження. Визначення проводили за допомогою лазерного кореляційного спектрометра “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Великобританія), обладнаного корелятором (multi computing correlator type 7032 ce). Одержані результати вказують, що препарат синаптосом містить частинки розміром від 0,2 до 20 мкм, однак переважна більшість частинок має розміри від 1,5 до 10 мкм, а середній діаметр синаптосом складає  $3,24 \pm 0,45$  мкм (рис. 11).

А

Б

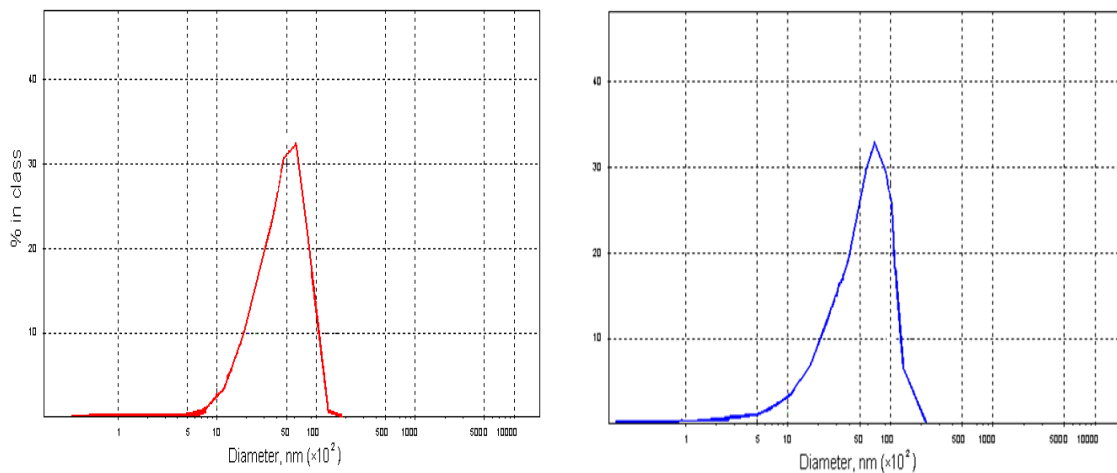


Рис. 11. Аналіз препарату синапсом методом лазерної кореляційної спектроскопії. А – синапсоми, одержані від контрольних тварин, Б – синапсоми одержані від тварин, що зазнали ГГ навантаження. Наведено типовий графік, вимірювання проводили з використанням трьох препаратів синапсом.

### ***2.2.1.2. Аналіз препаратів синапсом, одержаних з контрольних тварин та тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження, методом проточної цитометрії***

Порівняльну характеристику препаратів контрольних синапсом та синапсом, одержаних з тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження, проводили на проточному цитометрі COULTER EPICS XL. Розмір частинок у препаратах визначався за прямим розсіюванням (FS), а цитоплазматична гранулярність визначалася за бічним розсіюванням (SS).

Цитометричні дослідження показали, що характерне положення плями синапсом в системі координат FS LOG/SS LOG не відрізняється між контрольними синапсомами та синапсомами після гіпергравітаційного впливу. Було показано, що величина FS, яка є пропорційною розміру частинок, дещо знижувалася в препараті ГГ-синапсом в порівнянні з НГ-синапсомами, що вказує на незначне зменшення розміру синапсом,

одержаних з тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження (рис.12). Ці зміни не були статистично значимими.

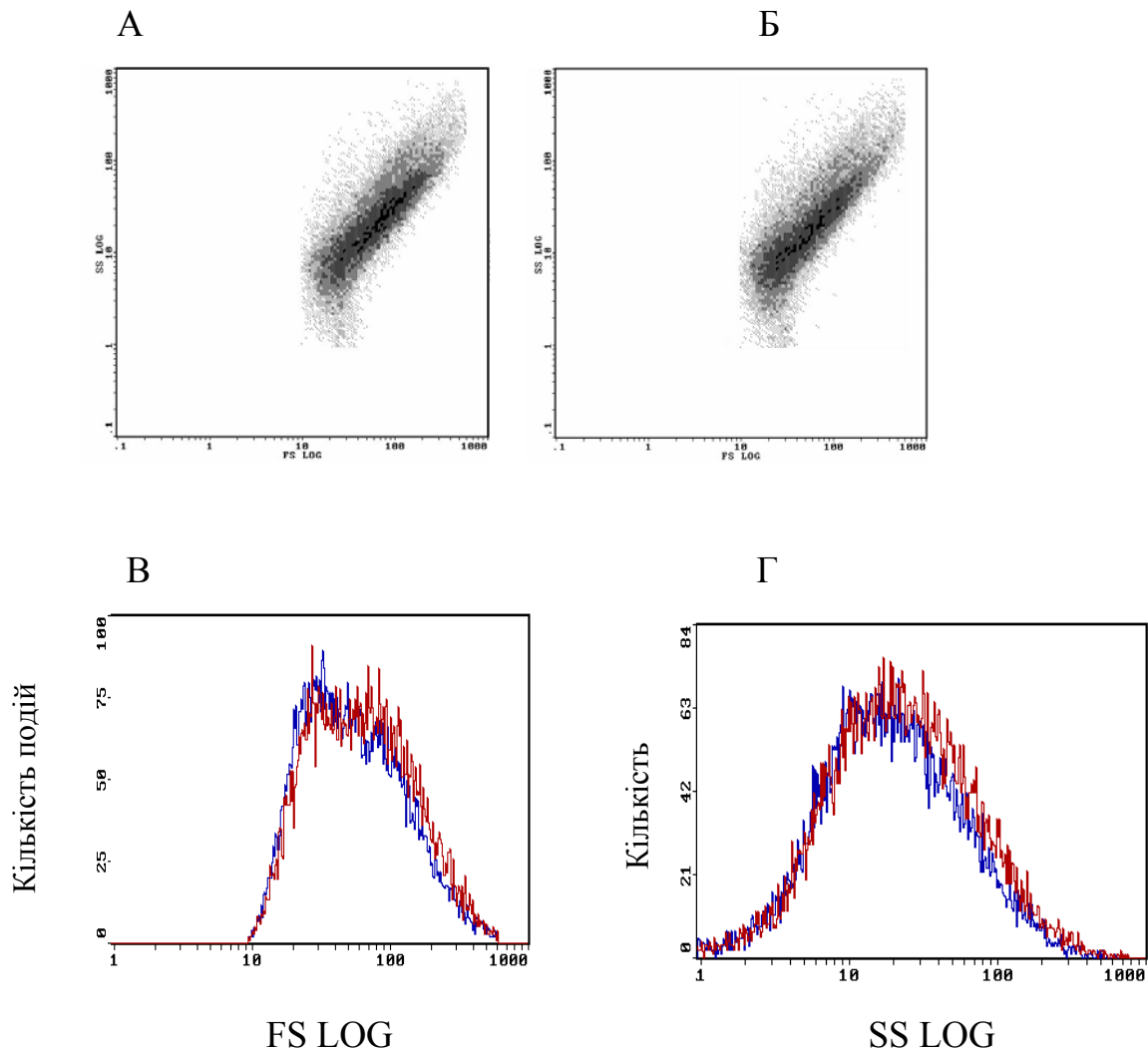


Рис. 12. Аналіз препаратів синапсосом методом проточної цитометрії. Гістограма розподілу частинок в системі координат FS LOG/SS LOG для контрольних синапсосом (А) та гіпергравітаційних синапсосом (Б). Розподіл частинок за розміром (В) та гранулярністю (Г) для контрольних синапсосом (червона лінія) та ГГ-синапсосом (синя лінія). Аналіз проведено на 20000 частинок. Усі зразки було проаналізовано з однаковими установками проточного цитометра.

Показник SS є відображенням внутрішньої структури досліджуваних частинок, зокрема, цитоплазматичної гранулярності синапсосом, що зумовлена переважно розміром та кількістю синаптичних везикул в нервовому закінченні. Було показано, що значення SS знижується незначною мірою в препараті

гіпергравітаційних синапсосомах в порівнянні з контрольними синапсосомами. Ці зміни не були статистично значимими (рис. 12).

Оскільки синапсосоми зберігають усі характеристики інтактного нервового закінчення, нами було проведено оцінку основних функціональних характеристик, що забезпечують процес передачі нервового імпульсу, а саме, мембранного потенціалу.

### ***2.2.1.3. Оцінка мембранного потенціалу нервових закінчень, одержаних з контрольних тварин та тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження***

Потенціал плазматичної мембрани відіграє значну роль як в процесах вивільнення нейромедіатора, так і в процесах його накопичення, тому нами було проведено оцінку мембранного потенціалу синапсосомах, одержаних з контрольних тварин та тварин, що зазнали впливу гіпергравітаційного навантаження. Потенціал плазматичної мембрани нервових закінчень визначали спектрофлуориметричним методом з використанням флуоресцентного зонда родаміна 6G. Цей позитивно заряджений ліпофільний зонд легко проникає через плазматичну мембрану та зв'язується з гідрофобними або негативно зарядженими ділянками мембрани, що призводить до гасіння флуоресценції. При деполяризації плазматичної мембрани зонд вивільнюється в середовище інкубації і інтенсивність флуоресценції зростає. При цьому спостерігається пропорційна залежність між інтенсивністю флуоресценції зонда та величиною мембранного потенціалу. Показано, що при додаванні родаміна 6G до ГГ-синапсосомах відбувається швидке зменшення інтенсивності його флуоресценції, а стаціонарний рівень досягається впродовж 2-3 хвилин. При подальшій інкубації синапсосомах з зондом значних змін флуоресценції не спостерігається. Таким чином, синапсосоми після гіпергравітаційного впливу зберігають здатність до генерації мембранного потенціалу та його підтримання на постійному рівні протягом тривалого часового проміжку. При порівняльному аналізі було виявлено, що інтенсивність флуоресценції зонда в

рівноважному стані для ГГ-синаптосом більше в порівнянні з контрольними синаптосомами, тобто величина мембранного потенціалу ГГ-синаптосом дещо знижена відносно норми, однак ця різниця не перевищує 10%. В той же час відповідь на деполяризацію високими (35мМ) концентраціями КСІ, не відрізняється в контрольних та ГГ-синаптосомах. (рис. 2.3.)

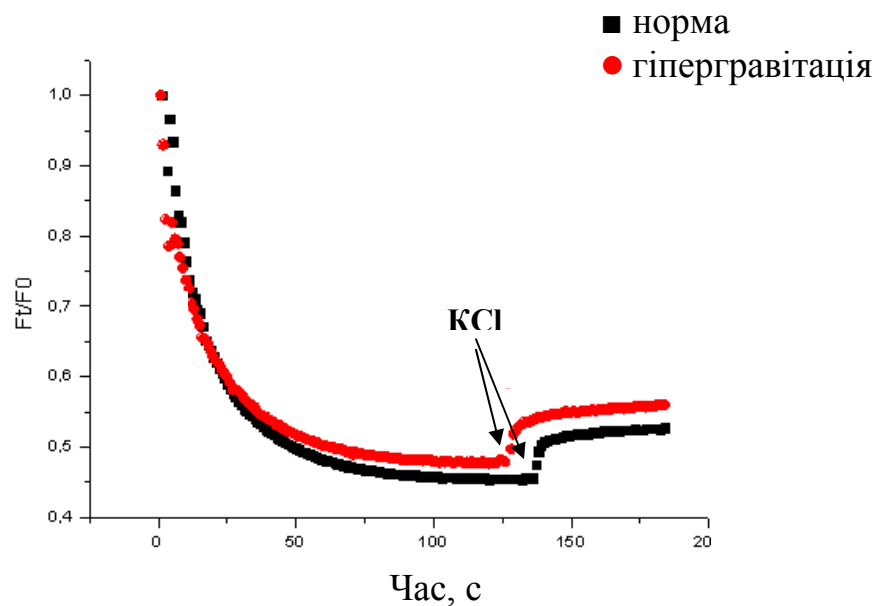


Рис. 13. Зміни флуоресценції потенціал-чутливого зонда родаміна 6 G в часі. Початкова ділянка кривої відображає накопичення зонду синаптосомами та встановлення рівноважного рівня флуоресценції, потім показано зміни флуоресценції при додаванні КСІ. Чорна лінія – контрольні синаптосоми, сіра лінія – ГГ-синаптосоми. Наведено типовий графік, вимірювання проводили з використанням чотирьох препаратів синаптосом.

## ***2.2 2. Визначення накопичення глутамату синаптосомами в нормі та за умов гіпергравітації***

Термінація глутаматергічної трансмісії відбувається за рахунок видалення нейромедіатора з синаптичної щілини шляхом його захвату нервовими клітинами. Забезпечується цей процес глутаматними транспортерами плазматичної мембрани, які можуть модулювати процес нейротрансмісії. Тому

здається досить важливим дослідити процес високоафінного натрій-залежного накопичення глутамата після впливу зміненої гравітації, і на наступному етапі дослідження було проведено оцінку кінетичних характеристик процесу високоафінного натрій-залежного накопичення глутамату контрольними та ГГ-синаптосомами. Захват нейромедіатора ініціювали додаванням L-[<sup>14</sup>C]глутамату/L-глутамату і визначали кількість накопиченого глутамата, використовуючи данні по специфічній активності препарату (251 мКю/ммоль).

Літературні дані містять досить неоднозначні відомості щодо кінетичних характеристик накопичення глутамата, що насамперед пов'язано зі складністю самого процесу, а також його значною залежністю від умов проведення експерименту. Тому для визначення оптимальних умов проведення дослідження було виміряно часову залежність накопичення глутамату та величину натрій-залежної компоненти процесу. Накопичення глутамату відбувається досить швидко, і переважна більшість нейромедіатору потрапляє всередину синаптосом протягом перших 3 хв, тому визначення початкової швидкості в наступних експериментах проводили в часових інтервалах, що не перевищували 1 хв.

Для визначення величини натрій-залежної компоненти порівнювали накопичення в натрій-вмісному середовищі (концентрація Na<sup>+</sup> 126мМ) та в безнатрієвому середовищі, де іони натрію замінювалися на іони NMDG, або на 125мМ сахарозу. Натрій-незалежна компонента становила не більше 5% від загальної кількості акумульованої мітки. Можна припустити, що це є неспецифічне зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами, оскільки кількість мітки не збільшується в часі. Нами було підтверджено залежність процесу накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату від температури, оскільки при 4°C не відбувалося зростання кількості мітки всередині синаптосом з часом.

Для визначення кінетичних характеристик накопичення глутамату (K<sub>м</sub> та V<sub>макс</sub>), досліджували залежність початкової швидкості процесу захвата від концентрації глутамата в середовищі інкубації. Підвищення концентрації L-[<sup>14</sup>C]глутамата в середовищі інкубації від 2 до 25 мкМ приводило до зростання



початкової швидкості накопичення глутамата. Результати, отримані при інкубації синапсом зі зростаючими концентраціями L-[<sup>14</sup>C]глутамату/L-глутамату, дозволили встановити гіперболічну залежність початкової швидкості накопичення від концентрації нейромедіатора для контрольних синапсом, та синапсом, отриманих із мозку щурів, що зазнали впливу ГГ. На основі отриманих даних з використанням методу подвійних обернених координат Лайнуівера-Берка було розраховано величини уявних констант Міхаеліса (Км) для контрольних та ГГ синапсом, які становили 10,7±2,5 мкМ в контролі та 6,7± 1,5 мкМ в ГГ (n=9).

Одержані значення Км узгоджуються з літературними даними, відповідно до яких Км для процесу захвата глутамата становлять від 1 до 36 мкМ. Слід підкреслити, що різниця величин Км для контрольних та ГГ синапсом не була статистично достовірною. Незначна відмінність цього кінетичного параметра для досліджуваних груп вказує, що вплив гіпергравітаційного стресу не призводить до зміни афінності транспортерів глутамату до субстрату.

В той же час максимальна швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамата (V<sub>макс</sub>) значно знижувалася в ГГ-синапсомах у порівнянні з контролем і дорівнювала 5,6±0,9 нмоль/хв/мг білка та 12,5±3,2 нмоль/хв/мг білка, відповідно. Різниця між значеннями V<sub>макс</sub> була статистично достовірною (P≤0,05) (Таблиця 1). Зміни максимальної швидкості можуть відбуватися за рахунок змін електрохімічних градієнтів іонів, необхідних для транспорту, змін каталітичної ефективності/кількості оборотів транспортерів, або зміни кількості транспортерів на плазматичній мембрані.

Таблиця 1

Кінетичні характеристики накопичення глутамату НГ- та ГГ-синапсомами

	V <sub>макс</sub> , нмоль/хв/мг білка	Км, мкМ
Норма	12,5±3,2	10,7±2,5
Гіпергравітація	5,6±0,9	6,7± 1,5

### ***2.2.3 Вплив симулянтів місячного та марсіанського ґрунту на накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синаптосомами, одержаними з тварин, що зазнали гравітаційного навантаження***

Показано, що в присутності симулянтів ґрунту збільшувалась початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) приблизно на 10%, що склало до  $2,5 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в контрольних синаптосомах та  $2,2 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в синаптосомах після гравітаційного навантаження і  $2,79 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в синаптосомах в присутності симулянту місячного ґрунту у контрольних синаптосомах і  $2,6 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка в присутності симулянту місячного ґрунту в синаптосомах після гравітаційного навантаження ( $P \leq 0,05$ , t-тест Стьюдента,  $n = 6$ ). Водночас, в присутності симулянту марсіанського ґрунту початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) істотно не змінювалась і складала  $2,59 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка у нормі та  $2,28 \pm 0,08$  нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup> білка за умов гіпергравітації. Таким чином, саме симулянт місячного ґрунту впливає на накопичення глутамату.

Оксид заліза є одним з основних компонентів місячного та марсіанського ґрунту пилу, тому ми використовували синтетичні наночастинки магнетиту в якості додаткового контролю. Було показано, що за умов гіпергравітації синтетичні наночастинки не впливають на початкову швидкість поглинання L-[<sup>14</sup>C]глутамату в ізольованих нервових закінченнях. Таким чином, здатність змінювати поглинання глутамату за умов гіпергравітації є особливістю, що притаманна тільки симулянту місячного ґрунту.

Існує кілька основних факторів, які можуть впливати на початкову швидкість поглинання L-[<sup>14</sup>C]глутамату в синаптосомах: (\*) зміна мембранного потенціалу, оскільки він є рушійною силою для активного транспорту глутамату або (\*\*\*) зміни неспецифічного зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату на синаптосомах.

#### ***2.2.4 Мембранний потенціал нервових закінчень, одержаних з тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження, у присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу***

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-електрохімічний градієнт плазматичної мембрани є рушійною силою для транспортер-залежного накопичення глутамату, а зміни мембранного потенціалу можуть змінювати початкову швидкість цього процесу. Деполяризація плазмалеми в присутності 35 мМ KCl призводить до зниження початкової швидкості накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату.

За умов гіпергравітації в присутності симулянтів місячного та марсіанського пилу не спостерігається подальшого зростання флуоресценції зонда, що вказує на відсутність деполяризації плазматичної мембрани ізольованих нервових закінчень. Ми також використовували синтезовані наночастинки магнетиту в якості додаткового контролю і не виявили зміни мембранного потенціалу синаптосом у їх присутності.

#### ***2.2.5 Зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями, отриманими з головного мозку тварин, що зазнали гравітаційного навантаження, в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту***

Позаклітинний Na<sup>+</sup> був повністю замінений одновалентним органічним катіоном NMDG і з'ясувалось, що в присутності симулянту місячного ґрунту зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) з синаптосомами за 1 хв. зростало з 0,051 ± 0,015 нмоль/мг білка в контролі до 0,16 ± 0,02 нмоль/мг білка в присутності симулянта місячного ґрунту (P ≤ 0,05, t-тест Стьюдента, n=6). Симулянт марсіанського ґрунту подібного ефекту не мав: в його присутності зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синаптосомами становило 0,074 ± 0,02 нмоль/мг білка. Синтезовані наночастинки магнетиту, які були використані в якості додаткового контролю також не впливали на зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями.

### ***2.2.6 Оцінка зв'язування симулянтів місячного та марсіанського пилу з нервовими терміналями та тромбоцитами методом лазерної кореляційної спектроскопії***

Методом лазерної кореляційної спектроскопії була досліджена взаємодія симулянтів місячного та марсіанського пилу з ізольованими нервовими терміналями та тромбоцитами. Функцію розподілу частинок за розміром вивчали за допомогою лазерного кореляційного спектрометра “ZetaSizer-3” Malvern Instrument, Великобританія. Метод ґрунтується на процесі розсіяння світла на будь-якому мікрооб'єкті. В колоїдних розчинах, емульсіях та суспензіях наночасток завжди мають місце випадкові поступові переміщення часточок за рахунок броунівського руху – трансляційна дифузія, їх випадкове обертання – ротаційна дифузія, а також модуляція форм-фактору, яка відбувається внаслідок внутрішніх рухів. Усі види цих рухів призводять до зміни частоти розсіяного часточками світла. Ця зміна дуже невелика в порівнянні з частотою вихідного випромінення. При потраплянні на детектор вихідного та розсіяного світла виникає динамічна картина інтерференції, притаманної для суми коливань з дуже близькими частотами та відомої у фізиці як „биття”. Таким чином, весь інформаційний сигнал виявляється сконцентрованим в області низьких частот, де його аналіз виконується за допомогою звичайної радіовимірювальної техніки – багатоканальних аналізаторів спектру та колориметрів. Лазерний кореляційний спектрометр, який використовують для досліджень, обладнаний корелятором (multi computing correlator type 7032 ce).

Методом лазерної кореляційної спектроскопії показано, що середній діаметр синаптосом складає  $3,24 \pm 0,1$  мкм. В присутності частинок походження місячного пилу JSC-1a в концентрації 2,5 мг/мл в суспензії синаптосом діаметр останніх збільшувався та складав  $5,16 \pm 0,7$  мкм (рис.14). Збільшення середнього діаметру синаптосом після додавання неорганічних

частинок JSC-1a природного походження свідчить про зв'язування наночастинок з нервовими терміналами.

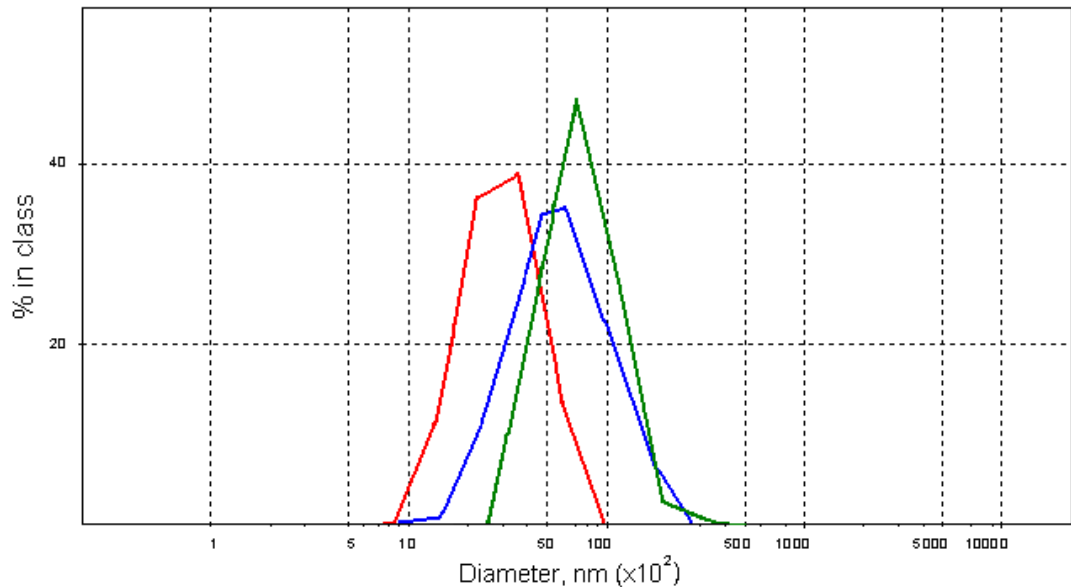


Рис.14. Аналіз препарату синаптосом в присутності частинок місячного пилу JSC-1a в концентрації 2,5 мг/мл методом лазерної кореляційної спектроскопії.

Аналогічні експерименти були проведені на тромбоцитах крові кроля. Показано, що середній діаметр тромбоцитів складає  $2,50 \pm 0,09$  мкм. В присутності частинок місячного пилу JSC-1a в концентрації 2,5 мг/мл в суспензії тромбоцитів діаметр останніх збільшувався та складав  $3,0 \pm 0,1$  мкм. Таким чином, показано зв'язування наночастинок з тромбоцитами, про що свідчить збільшення середнього діаметру тромбоцитів в присутності неорганічних частинок місячного пилу JSC-1a.

Дані, отримані методом лазерної кореляційної спектроскопії, були підтвержені з використанням цитофлуориметрії на проточному цитометрі COULTER EPICS XL. Розмір частинок у препаратах визначався за прямим світлорозсіюванням (FS), а цитоплазматична гранулярність визначалася за бічним світлорозсіюванням (SS). Цитометричні дослідження вказують на наявність зсуву характерного положення плями тромбоцитів в системі

координат FS LOG/SS LOG при додаванні місячного пилу JSC-1a (рис. 15-17).  
Було показано збільшення гранулярності тромбоцитів.

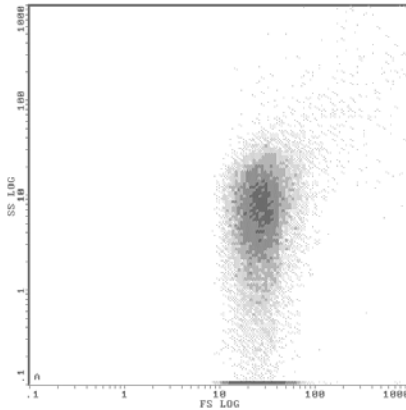


Рис.15. Аналіз препарату JSC-1a (концентрація 2,5 мг/мл) методом проточної цитометрії.

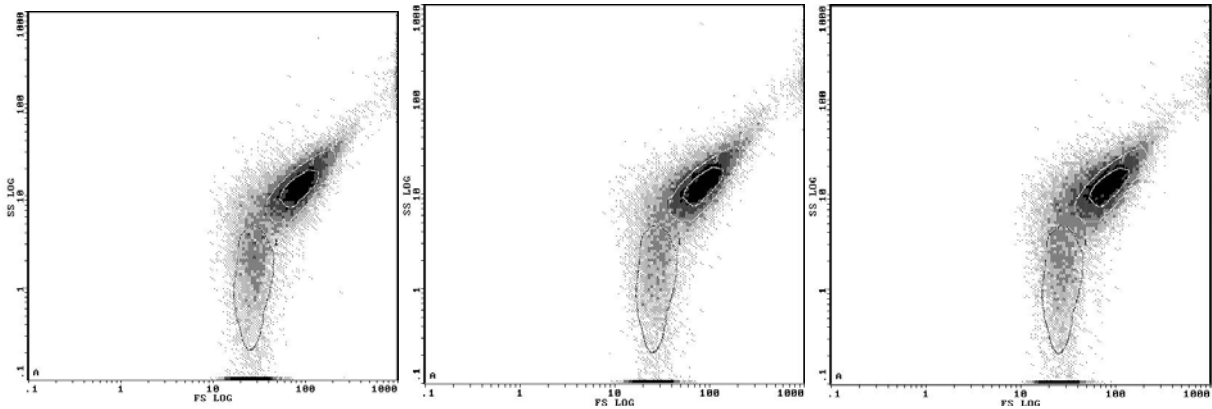


Рис.16. Аналіз препарату тромбоцитів (концентрація 0,25 мг/мл) методом проточної цитометрії . Діаграми отримані через 4 хв.

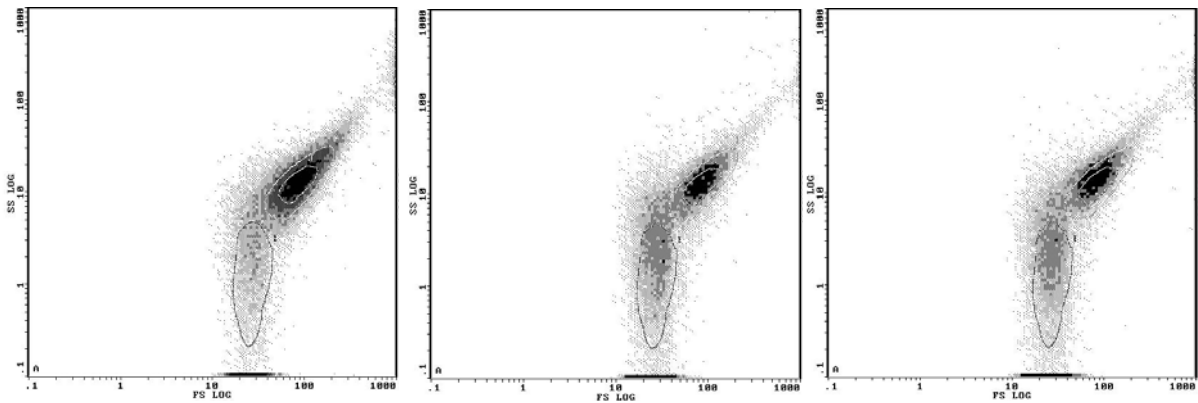


Рис.17. Аналіз препарату тромбоцитів (концентрація 0,25 мг/мл) в присутності JSC-1a (концентрація 2,5 мг/мл) методом проточної цитометрії. Діаграми отримані через 4 хв.

### ***2.2.7 Оцінка зв'язування симулянтів місячного та марсіанського пилу з нервовими терміналами методом електронного парамагнітного резонансу***

Для проведення подальших досліджень щодо взаємодії нервових терміналей та тромбоцитів з симулянтами місячного та марсіанського пилу необхідно розробити методику відокремлення незв'язаного симулянта від нервових терміналей та тромбоцитів, зв'язаних з симулянтом. Проблема пов'язана з тим, що центрифугування, за допомогою якого виділяється препарат синаптосом та тромбоцитів, призводить к сумісному осадженню як синаптосом, так і незв'язаного місячного та марсіанського пилу. В той час як для дослідження активації або агрегації тромбоцитів необхідно відокремити тільки ті тромбоцити, які зв'язалися з симулянтами.

Для розробки методики використовували синтетичні наночастинки магнетиту без покриття, що дає можливість використовувати метод електронного парамагнітного резонансу. Препарат синаптосом після взаємодії з наночастинками наносили на шар фіколу, концентрація якого складала 13%, потім центрифугували 20 с при 10000 g та фракціонували препарат. З використанням методу електронного парамагнітного резонансу аналізували наявність сигналу в фракціях. Показано, що синаптосоми зі зв'язаними наночастинками накопичуються впродовж границі розділення щільності між фіколом та стандартним сольовим розчином.

З використанням цієї методики був проаналізований препарат синаптосом після взаємодії з симулянтами місячного та марсіанського пилу, які також наносили на шар фіколу з концентрацією 13%, потім центрифугували 20 с при 10000 g. Методом електронного парамагнітного резонансу аналізували наявність сигналу в усіх фракціях. Показано, що фракції симулянтів місячного

пилу з магнітними властивостями не зв'язуються з синаптосомами, здатні долати шар фіколу та локалізуються у осаді. Симулянти марсіанського пилу з магнітними властивостями також не зв'язуються з синаптосомами, але не осаджуються, а навпаки залишаються у надосаді. Ми вважаємо, що це може бути пов'язано з неоднорідністю розміру та складу наночастинок симулянту. Ці дані узгоджуються та підтверджують наші попередні результати, де аналоги місячного та марсіанського ґрунту були охарактеризовані методом фотонної кореляційної спектроскопії та визначено, що препарат симулянтів містить мінорну фракцію нанорозмірних частинок. Складність дослідження впливу місячного та марсіанського ґрунту полягає у тому, що вони складаються з суміші різних частинок, кожна з яких може діяти на клітини за власним механізмом. Вивчення ранніх нейротоксичних ефектів від вдихання повітря з домішками алюмінію і/або марганцю показали, що субклінічний неврологічні симптоми і низький рівень фосфоліпід-зв'язуючого білка Clara cell protein CC16 можуть бути пов'язані з інтерналізацією іонів Al з ліпідною фракцією епітелію легень, що в свою чергу може допомогти іонами Al долати гемато-енцефалічний бар'єр. Оксид заліза викликає загибель клітин внаслідок пошкодження мембрани, а кремнезем викликає розвиток запалення, без значної загибелі як пухлинних так і нормальних клітин. Основні компоненти місячного ґрунту, зокрема FeO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MnO, є, з одного боку мікроелементами, які необхідні для росту і функції мозку, а з іншого боку нейротоксичними сполуками з тяжкими наслідками для здоров'я людини. Таким чином, присутність потенційно токсичних металів у складі місячного ґрунту повинне бути прийнято до уваги при оцінці ризику нейротоксичності.

Отримані нами експериментальні дані дають можливість заключити, що дія симулянтів місячного та марсіанського пилу на зв'язування глутамату з синаптосомами не пов'язана з компонентами з пилу, які мають магнітні властивості.



### 2.2.8 Оцінка комбінованого впливу гіпергравітації та аналогів місячного та марсіанського пилу на вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервових закінчень головного мозку та закислення внутрішньоклітинних компартментів нервових терміналей

В експериментах з використанням рН-чутливого флуоресцентного зонду акридинового оранжевого показано, що протонний градієнт синаптичних везикул знижується після гравітаційного навантаження тварин. Дія симулянтів місячного та марсіанського пилу на контрольні та «гравітаційні» нервові терміналі, суттєво не відрізняється (Рис.18). Таким чином, за умов присутності місячного та марсіанського пилу нервові терміналі зберігають здатність підтримувати певний протонний градієнт.

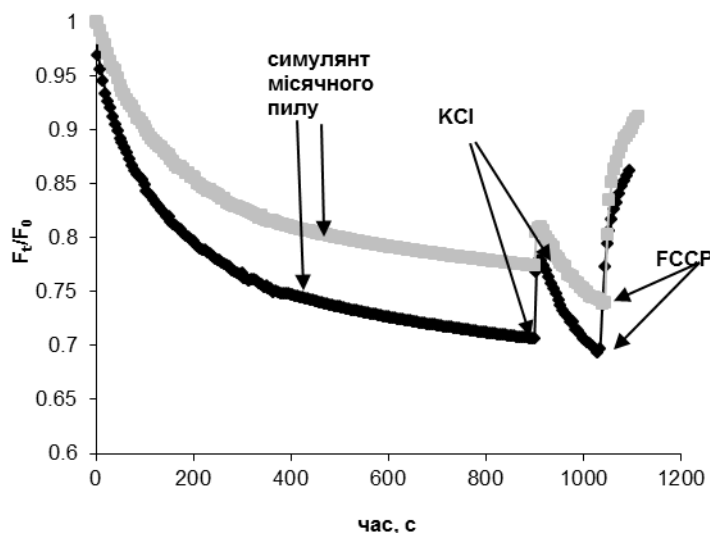


Рис.18. Аналіз закисленості контрольних (чорна лінія) і «гравітаційних» (сіра лінія) синапсів з використанням рН-чутливого флуоресцентного зонда акридинового оранжевого.

З використанням міченого L-[<sup>14</sup>C]глутамату показано збільшення вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервових закінчень, ізолюваних з головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження. Наявність симулянтів місячного та марсіанського пилу у середовищі інкубації суттєво не впливає на вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з контрольних та «гравітаційних» нервових

закінчень. Синтезовані наночастинки магнетиту мають аналогічний ефект з симулянтами місячного та марсіанського пилу щодо впливу на вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервових закінчень та протонний градієнт синаптичних везикул.

### **2.3. Попередні експерименти щодо створення карбонвмісного аналогу марсіанського пилу та оцінки його впливу на транспортер-залежне накопичення нейромедіаторів нервовими терміналами головного мозку щурів**

Щодня на Землю падають тонни вуглецевих молекул в частинках пилу та в метеоритах. Нещодавній *nanoSIMS*-аналіз вуглецю з Тісінтського марсіанського метеориту надав докази існування в минулому підземних органічних рідин на Марсі. 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. Оскільки нативний марсіанський пил може включати в себе вуглець органічного походження, було розроблено новий аналог марсіанського пилу, комбінуючи вуглець (карбонові точки, синтезовані з амінокислоти бета-аланіну шляхом нагрівання за особливих умов) та неорганічний аналог марсіанського пилу, отриманий з вулканічного попелу (JSC-1a/JSC, Orbitec Orbital Technologies Corporation, Madison, Wisconsin). Карбонові точки були синтезовані та надані Проф. О.П.Демченко та М.Декалюк.

$\gamma$ -Аминомасляная кислота (ГАМК) та глутамат є основними гальмівним та збуджуючим нейромедіаторами у центральній нервовій системі, що беруть участь у більшості аспектів нормального функціонування мозку. Дослідження були зосереджені на аналізі комбінованого впливу вищевказаних компонентів на  $\text{Na}^+$ -залежне поглинання  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ , яке є одним з найважливіших характеристик ГАМК-ергічної передачі. Додавання суміші карбонові точки/аналог марсіанського пилу (у концентраціях 2 мг/мл і 2 мг/мл, відповідно) призводило до зменшення інтенсивності поглинання  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  нервовими терміналами головного мозку (Рис.19). 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. Аналогічні експерименти були проведені для аналізу впливу карбонвмісного марсіанського пилу на накопичення L- $^{14}\text{C}$ глутамату нервовими терміналами головного мозку (Рис.20). Було показано, що цей ефект був пов'язаний виключно з активністю карбонових точок, але не з неорганічною компонентою аналога.

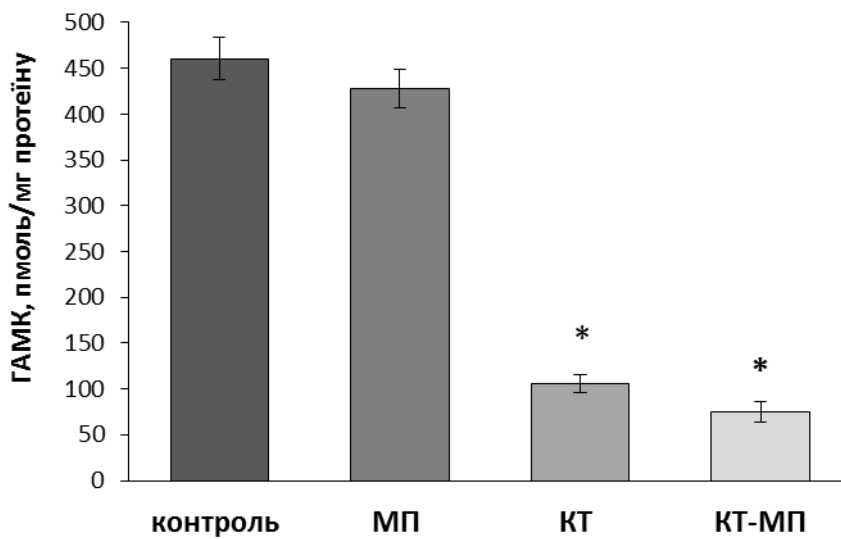


Рис.19 Накопичення  $^3\text{H}$ ГАМК нервовими терміналами головного мозку впродовж 5 хв. за присутності карбонових точок (КТ) у концентрації 2мг/мл та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2мг/мл.

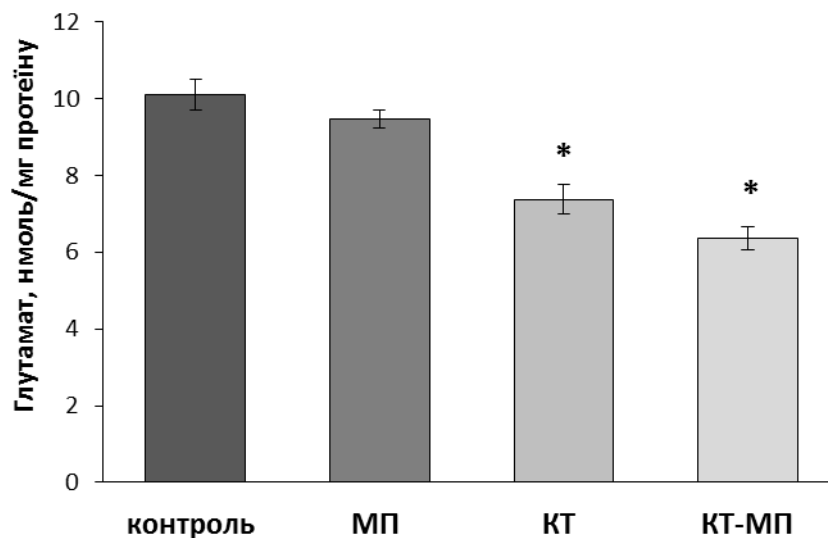


Рис.20 Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами головного мозку впродовж 10 хв. за присутності карбонових точок (КТ) у концентрації 2мг/мл та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2мг/мл.

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.

Отже, місячний та марсіанський пил не змінюють ацидифікацію синаптичних везикул та 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 терміналами головного мозку, але не впливає на активне накопичення та вивільнення глутамату, мембранний потенціал та ацидифікацію синаптичних везикул. Досліджено вплив симулянтів місячного та марсіанського пилу на процеси, пов'язані з міжклітинною взаємодією.

### РОЗДІЛ 3

#### Обговорення результатів

Вплив місячного ґрунту на тканини, які опосередковано зазнають його дії є малодослідженим питанням. Водночас експериментальні данні вказують на те, що місячний пил може бути шкідливим для здоров'я людини. Ультрадисперсні частинки не тільки ефективно затримуються в носовій порожнині та дихальних шляхах, але і транспортуються та перерозподіляються між різними органами [9,10,11,13]. Було показано, що після вдихання, ультрадисперсні частинки можуть долати гемато-енцефалічний бар'єр в деяких ділянках мозку Oberdörster і співавт. [10], причому 20% з них осідають на слизовій оболонці носа і можуть переміщатися до нюхової цибулини. Тверді частинки можуть переноситися через плазматичну мембрану в клітину шляхом ендоцитозу [14, 15] або інших механізмів [16]. На підставі наших даних, отриманих за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії показано існування фракції частинок з малим розміром в симулянтах місячного та марсіанського ґрунту. Це дозволяє припустити, що ендоцитоз може бути одним з механізмів, за допомогою якого компоненти місячного та марсіанського ґрунту можуть потрапляти всередину нервових закінчень

Досліджено вплив симулянтів місячного та марсіанського ґрунту за умов гіпергравітації на ключові процеси, що лежать в основі синаптичної передачі. Мембранний потенціал нервових закінчень є важливим фактором для спонтанної та стимульованої активності мозку. Використовуючи потенціал-чутливий флуоресцентний зонд родамін 6G, було показано, що мембранний потенціал нервових закінчень зменшувався за умов гіпергравітації, але присутність обох симулянтів не впливала на мембранний потенціал як в нормі, так і за умов гіпергравітації. Це означає, що цілісність і енергетичний стан нервових закінчень залишилися незмінними. Підтримання мембранного потенціалу везикул забезпечує належне вивільнення глутамату з нервових закінчень шляхом екзоцитозу в присутності місячного та марсіанського ґрунту.

Вплив симулянту місячного ґрунту на зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату в нервових закінченнях за умов гіпергравітації було проаналізовано в умовах, коли Na<sup>+</sup>-залежне накопичення глутамату значно пригнічене. Для цих цілей ми використовували середовище з низькою концентрацією Na<sup>+</sup>. Було встановлено, що за цих умов симулянт місячного ґрунту викликав статистично значуще збільшення зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату в нервових закінченнях. Симулянт марсіанського ґрунту істотно не впливав на зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з нервовими закінченнями. Зміни зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату, впливають на визначене значення початкової швидкості Na<sup>+</sup>-залежного транспорту L-[<sup>14</sup>C]глутамату, і спостерігалось помітне збільшення початкової швидкості в присутності симулянта місячного ґрунту, в той час як застосування симулянта марсіанського ґрунту або магнітних наночастинок істотно не впливало на поглинання L-[<sup>14</sup>C]глутамату за умов гіпергравітації. Збільшення зв'язування глутамату за умов гіпергравітації може змінити позаклітинний рівень глутамату у мозку. Беручи до уваги значну поверхню нервових закінчень в мозку, такі зміни можуть бути достатніми, щоб змінити концентрацію глутамату в міжклітинній рідині мозку. Підтримання гомеостазу глутамату у мозку, який є вкрай важливим для правильної синаптичної передачі, за таких умов може бути порушено.

Неясно, який тип взаємодії відбувається між частинками симулянта місячного ґрунту та плазматичною мембраною нервових закінчень без зміни цілісності мембрани та мембранного потенціалу, який в той же час підвищує зв'язування глутамату. Слід підкреслити, що цей ефект є специфічним для симулянта місячного ґрунту, і не спостерігається в присутності симулянта марсіанського ґрунту та наночастинок магнетиту. Ми припустили, що це може бути пов'язано з деякими особливостями симулянта місячного ґрунту в порівнянні з іншими частинками. Місячний пил складається з агглютинатів з гострими зубчастими краями, які можуть більш ефективно взаємодіяти з поверхнею мембрани та викликати патофізіологічні зміни. Крім того, місячний пил має значну реакційну поверхню, високий вміст металічного заліза і велику

площею поверхні за рахунок пористості. Ми припустили, що збільшення зв'язування глутамату з нервовими закінченнями в присутності симулянта місячного ґрунту може бути пов'язано зі змінами на поверхні плазматичної мембрани.

Унікальні особливості місячного ґрунту полягають в особливих умовах його формування при тривалому впливі на нього випромінювання у безкисневій атмосфері. Ці особливості обумовлюють високу токсичність місячного ґрунту, яка перевищує токсичність симулянтів, що походять з матеріалів на Землі [27]. В умовах Місяця, пил існує в первозданному стані, що зберігає реакційну здатність поверхні частинок [5]. Крім того, відмінності у властивостях ґрунту відрізняються в різних регіонах і повне розуміння хімічної реактивності можливе лише при *in situ* аналізі, щоб мати уявлення про типи реакцій, які проходять при взаємодії ґрунту з органічними молекулами в умовах Місяця [28].

Контакт з частинками ґрунту викликає подразнення, запалення. Крім гравітації стрес, УФ та радіація в умовах *in situ* можуть посилити шкідливу дію ґрунту на організм ссавців. Було чітко продемонстровано, що місячний пил, а також тверді наночастинки викликають запалення [13, 17]. Обробка альвеолярних макрофагів симулянтами місячного та марсіанського ґрунту показала дозо-залежне підвищення цитотоксичності, викликаного пошкодження переважно субпопуляції клітин супресорів, що загалом призводить до збільшення співвідношення кількості активаторів (RFD1+) та супресорів (RFD1+7+) [29]. Помітного збільшення відсотка нейтрофілів не спостерігалось в жодній з груп, через 4 години після обробки симулянтном ґрунту, але виявлялось у всіх оброблених групах після 24 год. Це спостереження вказує на те, що пил не володіє гострою токсичністю, а ефект був поступовим, для нейтрофілів потрібен деякий час для спрямування та накопичення в легенях [6,7]. Lam і співавт. [6,7] прийшли до висновку, що гострі наслідки дії ґрунту в легенях вказують на те, що місячний пил є більш токсичним, ніж  $TiO_2$ , а ефект марсіанського ґрунту можна порівняти з кварцом. У довгострокових місяях



очевидне збільшення тривалості впливу планетарного пилу. Lam і співавт. [6,7] показали, що при збільшенні тривалості знаходження симулянтів місячного та марсіанського ґрунту в легенях від 7 до 90 днів гострі запальні реакції переходять у хронічне запальне ураження. Ушкодження легень були більш тяжкими при попередній обробці симулянтів ґрунту озonom. Вплив озону на симулянт місячного ґрунту був неадитивним [6,7]. В умовах мікрогравітації, 1) відкладення в легенях людини частинок діаметром 1 мкм не зменшувалось, 2) функції макрофагів у тому числі процес фагоцитозу були пригнічені, 3) реакції запалення в легенях змінювались [30]. В умовах мікрогравітації ризик вдихання ґрунту збільшений за рахунок меншого осідання частинок. Частинки, що вдихаються, відкладаються в легенях і можуть зберігатись там протягом тривалого часу [31, 32]. Вдихання частинок різного розміру може негативно впливати на дихальну і серцево-судинну систему, внаслідок запалення дихальних шляхів [33]. Запропоновано кілька сигнальних механізмів, які можуть брати участь у реакціях запалення і пов'язані з цитотоксичністю ґрунту. Дослідження залежності концентрація-ефект симулянтів місячного ґрунту було проведено на лінії мишачих макрофагів mRAW 264.7. Результати показали, що симулянт місячного ґрунту в концентрації 50-2000 мкг/мл викликає підвищення експресії індукцибельної NO-синтази [17].

У цьому дослідженні ми виявили, що симулянт місячного ґрунту за умов гіпергравітації спричинює збільшення зв'язування глутамату з ізольованими нервовими закінченнями, що може порушити гомеостаз глутамату в головному мозку, вкрай необхідний для правильної синаптичної передачі. У довгострокових місяях поєднання умов зміненої гравітації з постійним контактом з частинками пилу можуть посилити його токсичну дію. Подальші дослідження механізмів дії симулянтів місячного та марсіанського ґрунту відкриє нові способи профілактики нейрозахворювань шляхом усунення або зменшення нейротоксичних ризиків.

## ВИСНОВКИ

Аналоги місячного (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec Орбітальна Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США) та марсіанського (JSC, Mars-1A, ORBITEC Orbital Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США) ґрунту/пилу були охарактеризовані методом фотонної кореляційної спектроскопії, визначений середній розмір частинок симулянтів (зокрема і мінорної фракції частинок з малим діаметром) до і після обробки ультразвуком.

Методом лазерної кореляційної спектроскопії показано збільшення середнього діаметру нервових терміналей та тромбоцитів в присутності симулянту місячного пилу, що свідчить про зв'язування симулянтів з нервовими терміналами та тромбоцитами.

В присутності симулянта місячного ґрунту зростає зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів (синаптосомами) в середовищі з низькою концентрацією Na<sup>+</sup>.

В присутності симулянта місячного ґрунту зростає зв'язування L-[<sup>14</sup>C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів (синаптосомами) за низької температури (+4°C).

Показано, що симулянт марсіанського ґрунту та наночастинки магнетиту не викликають змін у зв'язуванні L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синаптосомами.

В експериментах з використанням потенціал- та рН-чутливого флуоресцентних зондів було показано, що в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту, а також наночастинок магнетиту, синаптосоми зберігають здатність підтримувати мембранний потенціал та протонний градієнт синаптичних везикул.

Методом електронного парамагнітного резонансу показано, що фракції симулянтів місячного та марсіанського пилу з магнітними властивостями не зв'язуються з синаптосомами, тобто підвищення зв'язування глутамату з

синаптосомами у присутності симулянтів не пов'язано з компонентами пилу, які мають магнітні властивості.

В присутності симулянта місячного пилу в середовищі з низькою концентрацією  $\text{Na}^+$  зростає зв'язування L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з нервовими закінченнями, ізольованими з головного мозку щурів, що зазнали впливу гравітаційного навантаження.

Симулянт марсіанського пилу не викликає змін у зв'язуванні L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з нервовими закінченнями, ізольованими з головного мозку щурів, що зазнали впливу гравітаційного навантаження.

В експериментах з використанням потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміну 6G показано, що в присутності симулянтів місячного та марсіанського ґрунту, а також наночастинок магнетиту, нервові терміналі, ізольовані з головного мозку щурів, що зазнали впливу гравітаційного навантаження, зберігають здатність підтримувати мембранний потенціал.

Отже, ефект симулянту місячного ґрунту є унікальним у порівнянні з симулянтом марсіанського ґрунту та наночастинками магнетиту. Викликаючи зміни позаклітинного рівня глутамату, який є вкрай важливим для правильної синаптичної передачі, місячний пил може мати шкідливий вплив на гомеостаз цього нейромедіатора в ЦНС. За умов гіпергравітації місячний пил також порушує гомеостаз глутамату. У довгострокових місіях поєднання умов зміненої гравітації з постійним контактом з частинками пилу можуть посилити його токсичну дію.

**СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Guinan M., Horowitz J., Fuller C. Effects of hyperdynamic fields on input-output relationships and long-term potentiation in the rat hippocampus. *J. Gravit. Physiol.* – 1998. – V. 5. – P. 31–40.
2. Sun J.S., Tong W.G., Chen M.R., Xiao Z.W. Measurement of cerebral blood oxygen saturation with near infrared spectroscopy and its application in hypergravity. // *Space Medicine & Medical Engineering.* - 2003. - V. 16. - P. 371-373.
3. Rehders M., Grosshäuser B.B., Smarandache A., Sadhukhan A., Mirastschijski U., Kempf J., Dünne M., Slenzka K., Brix K. Effects of lunar and mars dust simulants on HaCaT keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts. // *Adv. Space Res.* - 2011. – V. 47. – P. 1200–1213.
4. Wallace W.T., Tayler L.A., Liu Y., Cooper B.L., McKay D.S., Chen B., Jeevarajan A.S. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring. // *Meteorit. Planet. Sci.* - 2009. – V. 44. – P. 961–970.
5. Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., Gerde P., Karlsson L.L., Loftus D.J., Prisk G.K., Stauer U., Tranfield E.M., van Westrenen W. Toxicity of lunar dust. // *Planetary and Space Science.* - doi.org/10.1016/j.pss.2012.05.023.
6. Lam CW, James JT, Latch JN, Hamilton RF Jr, Holian A. Pulmonary toxicity of simulated lunar and Martian dusts in mice: II. Biomarkers of acute responses after intratracheal instillation. // *Inhal. Toxicol.* - 2002. – V. 14. – P. 917–928.
7. Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Cowper S., Balis J., Muro-Cacho C. Pulmonary toxicity of simulated lunar and Martian dusts in mice: I. Histopathology 7 and 90 days after intratracheal instillation. // *Inhal. Toxicol.* - 2002. – V. 14. – P. 901–916.
8. Kao Y.Y., Cheng T.J., Yang D.M., Wang C.T., Chiung Y.M., Liu P.S. Demonstration of an Olfactory Bulb–Brain Translocation Pathway for ZnO Nanoparticles in Rodent Cells In Vitro and In Vivo. // *J. Mol. Neurosci.* - 2012. – V. 48. – P. 464–471.

9. Mikawa M., Kato H., Okumura M., Narazaki M., Kanazawa Y., Miwa N., Shinohara H. Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents. // *Bioconjug. Chem.* - 2001. – V. 12. – P. 510–514.
10. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. // *Inhal. Toxicol.* - 2004. - V. 16. – P. 437–445.
11. Wang H., Wang J., Deng X., Sun H., Shi Z., Gu Z., Liu Y., Zhao Y. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice. // *J. Nanosci. Nanotech.* - 2004. – V. 4. – P. 1019–1024.
12. Takeda K., Suzuki K.I., Ishihara A., Kubo-Irie, M., Fujimoto R., Tabata M., Oshio S., Nihei Y., Ihara T., Sugamata M. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. // *J. Health Sci.* - 2009. – V. 55. – P. 95–102.
13. Bourdon J.A., Saber A.T., Jacobsen N.R., Jensen K.A., Madsen A.M., Lamson J.S., Wallin H., Møller P., Loft S., Yauk C.L., Vogel U.B. Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. // *Part. Fibre. Toxicol.* - 2012. – V. 2. – P. 5.
14. Garred Ø., Rodal S.K., van Deurs B., Sandvig K. Reconstitution of clathrin-independent endocytosis at the apical domain of permeabilized MDCK II cells: requirement for a Rho-family GTPase. // *Traffic.* - 2001. – V. 2. – P. 26–36.
15. Xia T., Kovichich M., Liong M., Zink J.I., Nel A.E. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. // *ACS Nano.* - 2008. – V. 2. – P. 85–96.
16. Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im Hof V., Heyder J., Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. // *Environ. Health. Perspect.* - 2005. – V. 113. – P. 1555–1560.
17. Chatterjee A., Wang A., Lera M., Bhattacharya S. Lunar soil simulant uptake produces a concentration-dependent increase in inducible nitric oxide synthase

expression in murine RAW 264.7 macrophage cells. // *J. Toxicol. Environ. Health A.* - 2010. – V. 73. – P. 623–636.

18. Abbott N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. // *Cell. Mol. Neurobiol.* - 2000. – V. 20. – P. 131–147.

19. 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.

20. Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-beta-cyclodextrin - mediated changes in glutamate transport. // *Cell. Mol. Neurobiol.* - 2010. – V.30. – P.1013–1023.

21. Borisova T., Krisanova N. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. // *Adv. Space. Res.* – 2008. – V. 42. – P. 1971-1979.

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

23. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* – 1986.- V. 155. - P. 243-248.

24. 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. Mol. Bas. Dis.* - 2012. – V. 1822. – P. 1553–1561.

25. Danbolt N.C. Glutamate uptake. // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – V. 65. – P. 1–105.

26. Borisova T., Kasatkina L., Ostapchenko L. The proton gradient of secretory granules and glutamate transport in blood platelets during cholesterol depletion of the plasma membrane by methyl-beta-cyclodextrin. // *Neurochem. Int.* - 2011. – V. 59. – P.965–975.

27. Fubini B., Fenoglio I. Toxic potential of mineral dusts. // *Elements.* - 2007. – V. 3. – P.407–414.

28. Loftus D.J., Rask J.C., McCrossin C.G., and Tranfield E.M. The Chemical Reactivity of Lunar Dust: From Toxicity to Astrobiology Physics and Astronomy. // *Earth, Moon, and Planets.* - 2010. – V. 107. – P. 95–105.
29. Latch J.N., Hamilton R.F.Jr., Holian A., James J.T., Lam C.W. Toxicity of lunar and martian dust simulants to alveolar macrophages isolated from human volunteers. // *Inhal Toxicol.* - 2008. – V. 20. – P. 157–165.
30. Morimoto Y., Miki T., Higashi T., Horie S., Tanaka K., Mukai C. [Effect of lunar dust on humans: -lunar dust: regolith-]. // *Nihon Eiseigaku Zasshi.* - 2010. – V. 65. – P.479–485.
31. Darquenne C., Prisk G. Deposition of inhaled particles in the human lung is more peripheral in lunar than in normal gravity. // *Eur. J. Appl. Physiol.* - 2008. – V. 103. – P. 687–695.
32. Peterson J.B., Prisk G.K., Darquenne C. Aerosol deposition in the human lung periphery is increased by reduced-density gas breathing. // *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Del.* - 2008. – V. 21. – P. 159–168.
33. Frampton M.W., Stewart J.C., Oberdorster G., Morrow P.E., Chalupa D., Pietropaoli A.P., Frasier L.M., Speers D.M., Cox C., Huang L.S., Utell M.J. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. // *Environ. Health Perspect.* - 2006. – V. 114. – P. 51–58.

**Публікації по темі проекту (8 статей, з них 7 у міжнародних фахових виданнях), де зазначено, що дослідження проводились у рамках даного проекту:**

**Статті у фахових зарубіжних виданнях (сумарний «імпакт» фактор - 19):**

N. Krisanova L. Kasatkina R. Sivko A. Borysov A. Nazarova K. Slenzka, T. Borisova. Neurotoxic potential of lunar and martian dust: influence on Em, proton gradient, active transport, and binding of glutamate in rat brain nerve terminals. // *Astrobiology*. – 2013. – V. 13. P. 679-692 (імпакт фактор журналу 2,8).

Krisanova N., Borysov A., Sivko R., Ostapchenko L., Babic M., Horak D. Manipulation of brain nerve terminals by an external magnetic field using D-mannose-coated  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-sized particles and their effects on glutamate transport // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2014. - V. 5 - P. 778-788.

Borysov A., Krisanova N., Chunihin O., Ostapchenko L., Pozdnyakova N., Borisova T. A comparative study of neurotoxic potential of synthesized polysaccharide-coated and native ferritin-based magnetic nanoparticles. // *Croat.Med.J.* – 2014. - V. 55. - P. 195-205.

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.

Soldatkin O., Nazarova A., Krisanova N., Borysov A., Kucherenko D., Kucherenko I., Pozdnyakova N., Soldatkin A., Borisova T. 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.

Borisova T. 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

Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Nazarova A., Borysov A., Krisanova N., Borisova T. 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:**

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

#### **Тези:**

1) Крисанова Н., Сівко Р., Назарова А., Борисов А., Борисова Т. Вплив неорганічних наночастинок аналогів місячного / марсіанського пилу на мембранний потенціал, протонний градієнт, активний транспорт і зв'язування глутамату нервовими терміналами головного мозку. // *Міжнародна міждисциплінарна науково-практична конференція «Біологічно активні речовини та матеріали: фундаментальні та прикладні аспекти отримання та використання»*, Новий Світ, Крим, 27.05-01.06.2013. - Т. 2. - С. 395.

2) Borisova T., Nazarova A., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Neurotoxic potential of lunar and martian dust: influence on Em, proton gradient, active transport, and binding of glutamate in rat brain nerve terminals. // *13 Українська конференція з космічних досліджень*, Крим, 2.09-6.09.2013. – С. 218.

3) Shashkova I. A., Zakharov A. V., Dolnikov G. G., Kuznetsov I. A., Vorobyova E. A., Borisova T. Modeling the influence of lunar dust on the physical and biological systems. // *The fourth Moscow Solar System Symposium (4M-S3) Moscow 2013*. - Abstract # 4MS3-pS-27.

4) Borisova T., Nazarova A., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. A comparative study of neurotoxic potential of native Lunar/Martian dust simulants and synthetic nanoparticles of magnetite. // 14 Українська конференція з космічних досліджень, Ужгород, Україна, вересень 2014.

5) Voronova O., Sivko R., Borysov A., Nazarova A., Борисова Т. Disturbance of protein kinase C-dependent regulation of glutamate uptake by brain nerve terminals under conditions of hypergravity. // 14 Українська конференція з космічних досліджень, Ужгород, Україна, вересень 2014.

6) Dudarenko M., Pastukhov A., Krupko O., Pozdnyakova N., Nazarova A., Borysov A., Krisanova N., Dekaliuk M., Borisova T. Combined effects of burned organic carbon and inorganic Martian dust analogue on  $\text{Na}^+$ -dependent neurotransmitter uptake by brain nerve terminals. // 15-а Українська конференція з космічних досліджень, Одеса, Україна, серпень 2015, Збірник тез, С.38.

7) Krupko O., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Krisanova N., Borisova T. High-affinity sodium-dependent uptake and exocytotic release of [ $^3\text{H}$ ]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**

20-28 червня 2013 р керівник проекту Борисова Т.О. брала участь у роботі 34 Щорічної конференції Міжнародного товариства по гравітаційній фізіології «Гравітаційні ефекти від мікро до макробіології». 34 Щорічна конференція Міжнародного товариства по гравітаційній фізіології «Гравітаційні ефекти від мікро до макро біології» відбулася 23-28 червня 2013 р в Хонокумі Тойохаші центрі мистецтв у місті Тойохаші, Японія. Ця конференція є спільною Міжнародного товариства по гравітаційній фізіології та Тойохаші СОЗО Університету.

На цій конференції дослідниками з космічної та гравітаційної фізіології, біології та інших наук дискутувалися ефекти гравітації та космічного польоту на живі системи. Було представлено усну доповідь «Взаємодія симулянту

місячного ґрунту з нервовими терміналями головного мозку» на генеральній секції «Космічна Медицина».

Керівник проекту д.б.н. Борисова Т.О. брала участь у роботі 13 Української конференції з космічних досліджень, Крим, 2-6 вересня 2013. Було представлено 2 усних доповіді на різних секціях за результатами, отриманими при реалізації цього проекту. Під час проведення конференції було встановлено контакти, корисні для подальшої роботи по проекту.

У 2014 р керівник проекту д.б.н. Борисова Т.О. брала участь у роботі 14 Української конференції з космічних досліджень, яка проходила в Ужгороді. Було представлено усну доповідь за результатами, отриманими при реалізації цього проекту: «A comparative study of neurotoxic potential of native Lunar/Martian dust simulants and synthetic nanoparticles of magnetite». Під час проведення робочих зустрічей та консультацій у рамках спеціалізованих груп було встановлено корисні для подальшої роботи контакти.

У 2015 р 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».

### **Розвиток матеріально-технічної бази досліджень**

З використанням лазерного кореляційного спектрометра “ZetaSizer-3” Malvern Instrument, Великобританія, розроблено модельну систему для вивчення взаємодії частинок місячного та марсіанського ґрунту з нервовими терміналями та тромбоцитами.