

А. Г. Назарова, Н. Г. Позднякова, О. О. Воронова, О. Ю. Чуніхін, М. В. Піскова,
А. О. Пастухов, А. А. Борисов, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, Київ

ОЦІНКА БІОМОДУЛЯТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА НЕЙРОТОКСИЧНОСТІ АНАЛОГУ МІСЯЧНОГО ҐРУНТУ

При вдиханні ультрадисперсні частинки місячного ґрунту затримуються в носовій порожнині та дихальних шляхах і можуть переноситись у центральну нервову систему. Нейротоксичний потенціал місячного ґрунту досі не оцінено. Дослідження були зосереджені на аналізі впливу аналогу місячного ґрунту на ключові характеристики глутаматергічної нейротрансмісії, оскільки порушення гомеостазу глутамату, головного збуджувального нейромедіатора в ЦНС, є одним з основних аспектів патогенезу багатьох нейрологічних захворювань. Аналог місячного ґрунту (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec, Медісон, штат Вісконсин, США), а саме фракція нанорозмірних частинок, до і після обробки ультразвуком була охарактеризована методом фотонної кореляційної спектроскопії. З використанням міченого L-[¹⁴C]глутамату було показано, що у присутності аналога місячного ґрунту зростає зв'язування L-[¹⁴C]глутамату з ізольованими нервовими закінченнями головного мозку щурів (синапсомами) в середовищі з низькою концентрацією Na⁺, внаслідок чого реєструється підвищення початкової швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату нервовими закінченнями на 10% як у контрольних щурів, так і у тих, що зазнали гравітаційного навантаження. Ефект аналогу місячного ґрунту є унікальним і може призвести до зміни позаклітинного рівня глутамату, який є вкрай важливим для синаптичної передачі. Місячний ґрунт може мати шкідливий вплив на гомеостаз глутамату в центральній нервовій системі. Постійне подразнення від контакту з частинками ґрунту, особливо під час довгострокових місій, а також супутнє запалення, стрес, мікрогравітація, підвищена радіація, УФ-опромінення можуть посилити токсичний вплив ґрунту на організм людини.

Ключові слова: аналог місячного ґрунту, транспорт глутамату, глутаматергічна нейротрансмісія, нервові терміналі головного мозку.

ВСТУП

Пілотовані позаземні місії, які включають вихід у відкритий космос, вимагають оцінки ризику токсичності ультрадисперсного пилу. Було показано, що частинки місячного ґрунту сорбуються на скафандрах і потрапляють всередину космічних кораблів [35, 38]. В результаті прямого контакту з частинками місячного пилу у астронавтів протягом декількох місій «Аполло» спостерігалось подразнення очей, дихальних шляхів та шкіри.

Формування, склад і фізичні властивості місячного пилу та його вплив на здоров'я людини недостатньо охарактеризовані [28], хоча шкідливий вплив частинок місячного пилу на тканини, що безпосередньо зазнавали його дії, описувався в роботах [24, 25, 35]. В організмі ссавців ультрадисперсні частинки можуть тривалий час зберігатись в носовій порожнині, бронхах та альвеолах за рахунок дифузії, і окрім перерозподілу між різними органами транспортуватися вздовж сенсорних аксонів нюхового нерва до центральної нервової системи (ЦНС) [20, 30, 32, 34, 39]. В роботі [32] показано, що інтраназально введені тверді ультрадисперсні частинки (<100 нм)

після осідання на слизовій оболонці носоглотки можуть транспортуватись у ЦНС через нюховий нерв. У щурів приблизно 20 % ультрадисперсних частинок, що осідають на слизовій оболонці, можуть переміщатися до нюхової цибулини мозку. Це може забезпечити шлях надходження ультрадисперсних частинок в ЦНС в обхід гемато-енцефалічного бар'єру [32]. Наночастки TiO_2 були виявлені в мозку 6-тижневих мишей після підшкірного введення їх вагітним самкам [36]. Було показано, що крім головного мозку ультрадисперсні частинки можуть накопичуватися у печінці протягом 4—24 год після контакту [9, 32]. Тверді частинки можуть потрапляти у клітини шляхом ендцитозу [17, 40]. Однак Гейзер з співробітниками [18] припустили, що *in vitro* поглинання ультрадисперсних частинок в клітинах відбувається шляхом дифузії або адгезії, а не за допомогою жодного з очікуваних типів ендцитозу. 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 їхній токсичний потенціал [18].

Нейротоксичну дію місячного ґрунту досі не оцінено. Тривалість дії пилу під час довгострокової місії, особливо у поєднанні з іншими шкідливими для людини факторами, зокрема мікрогравітацією, радіацією, ультрафіолетом і т. д., може посилити його шкідливий вплив. Було продемонстровано, що місячний пил, а також тверді наночастинки є причиною запалення [9, 10], яке, як відомо, може змінювати проникність гемато-енцефалічного бар'єру [1]. Основне питання, яке було поставлене в роботі, чи може місячний пил викликати розвиток патологічних процесів, які обумовлюють нейротоксичність? У нашому дослідженні оцінку нейротоксичних ризиків для здоров'я від впливу аналогу місячного ґрунту (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec, Медісон, штат Вісконсин, США) проводили відповідно до рекомендацій з оцінки ризику нейротоксичності (US Environmental Protection Agency, 1998 року, згідно з пунктом 3 Оцінка небезпеки: 3.1.2 Дослідження на тваринах; 3.1.2.3 Нейрохімічні

наслідки нейротоксичності; 3.1.3.4. *In vitro* дані нейротоксикології) [7]. Методологічні підходи передбачали дослідження *in vitro* безпосереднього впливу аналогу місячного ґрунту на ключові характеристики глутаматергічної нейротрансмісії, зокрема на поглинання глутамату, основного збуджувального нейромедіатора в ЦНС [2—8, 13, 21—23, 37], нервовими закінченнями головного мозку при участі високоафінних Na^+ -залежних транспортерів.

МЕТОДИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Краніо-каудальне гіпергравітаційне навантаження (1 год, 10g) статевозрілих самців щурів Wistar вагою 100—120 г проводили у спеціально сконструйованій та виготовленій центрифугі з діаметром ротора 5.5 м, яка розташована у відділі нейрохімії Інституту. У дослідженнях використовували препарат ізольованих нервових терміналей, одержаних послідовним диференціальним центрифугуванням і центрифугуванням у градієнті густини фіколу-400 (Sigma) [12]. Концентрацію білку визначали за методом Ларсона з співробітниками [26]. Накопичення глутамату синапсосомами оцінювали з використанням L-[^{14}C]глутамату (Amersham). Процес накопичення ініціювали додаванням 420 нМ L-[^{14}C]глутамату (0.1 мкКі/мл), інкубували 1—10 хв при 37 °С. Аліквоти суспензії відбирали та обробляли двома способами: пропускали крізь скловолоконні фільтри Whatman GF/C (для синапсосом) або центрифугували на мікроцентрифугі «Eppendorf» протягом 20 с за 10000 g. Накопичення L-[^{14}C]глутамату визначали у аліквотах супернатанту та осаду в сцинтиляційній рідині OCS або ACS (Amersham) на лічильнику Tracor Analytic Delta 300 (США) [8].

РЕЗУЛЬТАТИ

Аналіз аналогу місячного ґрунту та синапсосом методом фотонної кореляційної спектроскопії. Методом лазерної кореляційної спектроскопії було проведено визначення середнього діаметра та функції розподілу за розміром частинок аналогу місячного ґрунту та ізольованих нервових терміналей до та після гравітаційного навантаження. Визначення проводили за допомогою лазер-

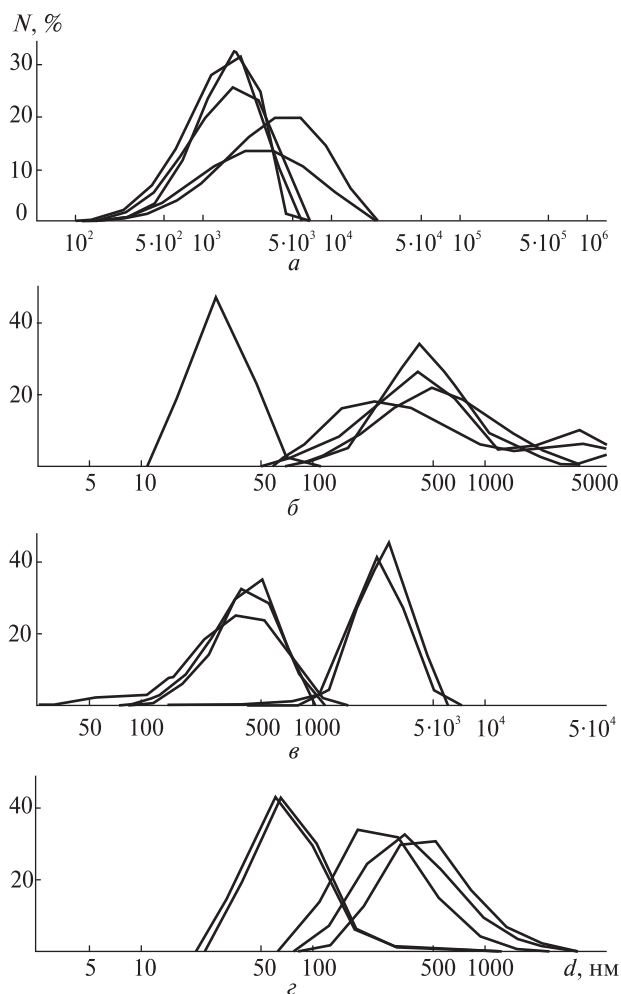


Рис. 1. Розподіл кількості N частинок аналога місячного ґрунту по значеннях їхнього діаметра d у суспензії (2 мг/мл) в стандартному сольовому розчині (на основі п'яти вимірювань по 1 хв) методом фотонної кореляційної спектроскопії: *a* — суспензія аналога місячного ґрунту до (*a*) та після обробки (*в*) ультразвуком (22 кГц, 1 хв), *б* — фракція частинок з малим діаметром у суспензії аналога до (*б*) та після обробки (*г*) ультразвуком

ного кореляційного спектрометра “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Великобританія), обладнаного корелятором (multi computing correlator type 7032 ce).

Середній розмір частинок у суспензії аналогу ґрунту в стандартному сольовому розчині був розрахований на основі п'яти вимірювань, кожне протягом 1 хв і становив 2500 ± 336 нм

для частинок аналога місячного ґрунту (рис. 1). Крім того, у препараті аналога була виявлена фракція частинок з малим розміром (приблизно 50—60 нм) (рис. 1, *б*). Для більш детального аналізу аналог піддавався обробці ультразвуком при 22 кГц протягом 1 хв, після чого розмір частинок знижувався більш ніж у два рази для аналога місячного ґрунту і складав 1110 ± 67 нм (рис. 1, *в*).

В експериментах використовувались ізольовані нервові закінчення (синапсоми) мозку контрольних щурів та щурів, що зазнали гіпергравітаційного навантаження. Одержані результати вказують, що препарат синапсомом містить частинки розміром від 0.2 до 20 мкм, однак переважна більшість частинок має розміри від 1.5 до 10 мкм, а середній діаметр синапсомом складає 3.24 ± 0.45 мкм як у контролі, так і в умовах гравітаційного навантаження (рис. 2).

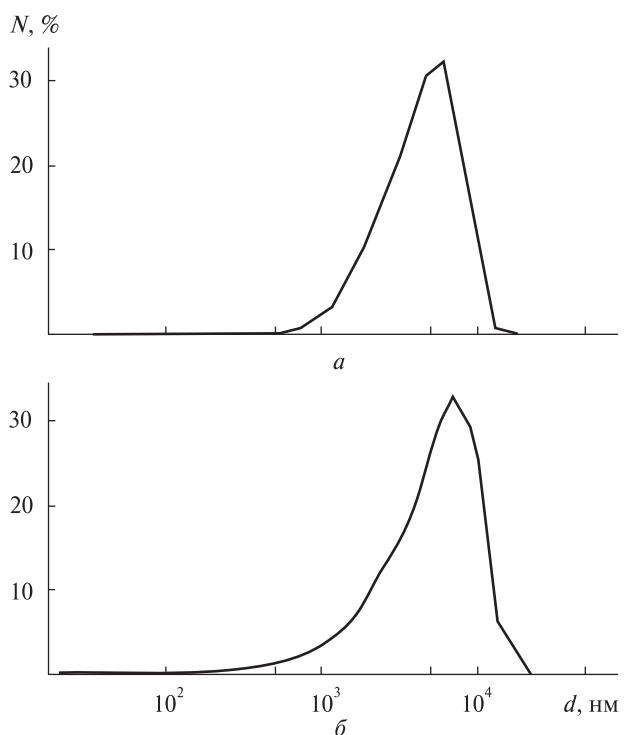


Рис. 2. Аналіз препарату синапсомом методом лазерної кореляційної спектроскопії: *a* — синапсоми, одержані від контрольних тварин, *б* — синапсоми, одержані від тварин, що зазнали гіпергравітаційного навантаження. Наведено типовий графік, вимірювання проводили з використанням трьох препаратів синапсомом

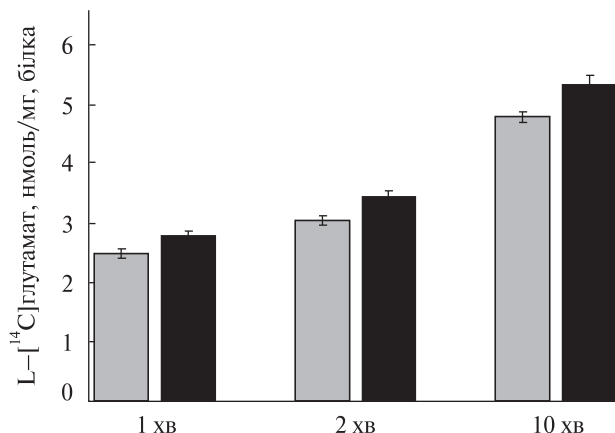


Рис. 3. Активне накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами у часі при відсутності (сірі стовпчики) та при наявності (чорні стовпчики) аналога місячного ґрунту (2 мг/мл). Накопичення ініціювали внесенням 10 мкМ глутамату (з 420 нМ L-[¹⁴C]глутамату) (0.1 мкКі/мл) до сусезії синапсом (0.2 мг/мл білка). Проби інкубували при 37 °С протягом 1, 2 та 10 хв та швидко осаджували. Результати представлені як середнє значення ± SEM на основі шести незалежних експериментів ($P \leq 0.05$ відносно контролю у відповідний проміжок часу, t -тест Стьюдента)

Таким чином, аналог місячного ґрунту містить частинки, розмір яких був у тому ж діапазоні та нижче, ніж розмір нервових закінчень, що обумовлює можливість їхньої взаємодії з плазматичною мембраною синапсом та впливу на функціонування мембранних білків.

Оцінка зв'язування L-[¹⁴C]глутамату з аналогом місячного ґрунту. Ми проаналізували чи може L-[¹⁴C]глутамат сорбуватись на поверхні аналога ґрунту. Це важливо, оскільки зниження концентрації L-[¹⁴C]глутамату в інкубаційному середовищі за рахунок сорбції може вплинути на точність визначення початкової швидкості накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами. Враховуючи наші дані про розмір частинок аналога місячного ґрунту (рис. 1), ми використовували фільтр Millipore (0.45 мкм) для їхнього відокремлення. У експериментах аналог ґрунту інкубували з 10 мкМ L-[¹⁴C]глутамату у стандартному сольовому розчині протягом 10 хв, а потім фільтрували через фільтр і промивали 3 мл стандартного сольового розчину. Було виявлено, що радіоактивність на фільтрах у присутності та

відсутності аналогу була однаковою, отже аналог не сорбує L-[¹⁴C]глутамат на своїй поверхні. Таким чином, наявність аналогу пилу не змінює концентрацію L-[¹⁴C]глутамату в середовищі інкубації.

Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами у присутності аналогу місячного ґрунту. Показано (рис. 3), що у присутності аналогу ґрунту збільшувалась початкова швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату приблизно на 10 %, що склало 2.5 ± 0.08 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка в контрольних синаптосомах і 2.79 ± 0.08 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка в синаптосомах у присутності аналога місячного ґрунту ($P \leq 0.05$, t -тест Стьюдента, $n = 6$) (рис. 3). Накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами за 10 хв складало 4.8 ± 0.09 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка в контролі та підвищувалось до 5.35 ± 0.15 нмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка під впливом аналога місячного ґрунту ($P \leq 0.05$, t -тест Стьюдента, $n = 6$). Аналог пилу посилював початкову швидкість накопичення L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами після гравітаційного навантаження також на 10 %.

Оксид заліза є одним з основних компонентів місячного ґрунту. Тому ми використали синтетичні наночастинки магнетиту як додатковий контроль. Було виявлено, що синтетичні наночастинки не впливають на початкову швидкість поглинання L-[¹⁴C]глутамату в ізольованих нервових закінченнях. Таким чином, здатність змінювати поглинання глутамату є особливістю, що притаманна тільки аналогу місячного ґрунту.

Зв'язування L-[¹⁴C]глутамату з нервовими закінченнями у присутності аналога місячного ґрунту. Одним з факторів, який може впливати на початкову швидкість поглинання L-[¹⁴C]глутамату синаптосомами, є зміна неспецифічного зв'язування L-[¹⁴C]глутамату. Оскільки Na⁺/K⁺-електрохімічний градієнт є рушійною силою для активного транспорту глутамату, зниження позаклітинної концентрації Na⁺ пригнічує роботу транспортерів глутамату і дозволяє оцінити зв'язування L-[¹⁴C]глутамату з плазматичною мембраною синапсом. Слід зазначити, що стандартний сольовий розчин містить 126 мМ Na⁺. Позаклітинний Na⁺ був повністю замінений одновалентним органічним катіоном N-метил-D-глюкаміном і з'ясувалось, що у присутності ана-

логу місячного ґрунту зв'язування L-[¹⁴C]глутамату (10 мкМ) з синаптосомами за 1 хв зросло з 0.05 ± 0.015 нмоль/мг білка в контролі до 0.15 ± 0.02 нмоль/мг білка у присутності аналога місячного ґрунту і за 10 хв суттєво не змінювалось ($P \leq 0.05$, *t*-тест Стьюдента, $n = 6$) (рис. 4).

Ми з'ясували, що наявність аналогу місячного пилу у середовищі інкубації суттєво не впливає на вивільнення L-[¹⁴C]глутамату з нервових закінчень до та після гравітаційного навантаження. Також виявилось, що місячний пил не змінює ацидифікацію синаптичних везикул у нервових терміналях, ізольованих з головного мозку щурів, що зазнали гравітаційного навантаження.

Обговорення результатів дослідження. Вплив місячного ґрунту на тканини, які опосередковано зазнають його дії, є малодослідженим питанням. Водночас експериментальні дані 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, 30, 32, 34, 39]. Показано, що після вдихання ультрадисперсні частинки можуть долати гемато-енцефалічний бар'єр в деяких ділянках мозку [32], причому 20 % з них осідають на слизовій оболонці носа і можуть переміщатися до нюхової цибулини. Тверді частинки можуть переноситися через плазматичну мембрану у клітину шляхом ендоцитозу [17, 40] або інших механізмів [18]. На основі наших даних, отриманих за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії, показано існування фракції частинок з малим розміром в аналозі місячного ґрунту. Це дозволяє припустити, що ендоцитоз може бути одним з механізмів, за допомогою якого компоненти місячного ґрунту можуть потрапляти всередину нервових закінчень.

У цьому дослідженні було оцінено вплив аналогу місячного ґрунту на ключовий процес, що лежить у основі синаптичної передачі. Вплив аналогу місячного ґрунту на зв'язування L-[¹⁴C]глутамату в нервових закінченнях було проаналізовано в умовах, коли Na⁺-залежне накопичення глутамату значно пригнічене. Для цих цілей ми використовували середовище з низькою

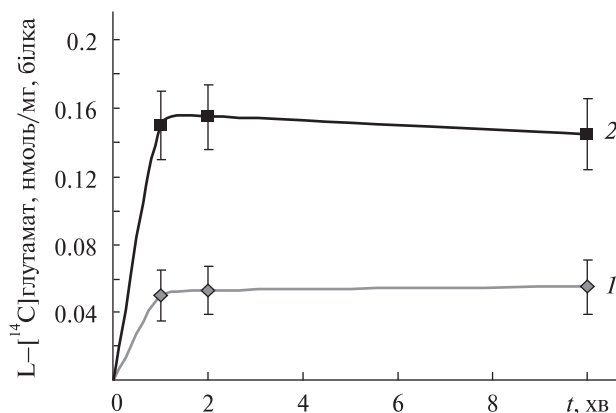


Рис. 4. Зв'язування L-[¹⁴C]глутамату з синаптосомами в середовищі з низькою концентрацією Na⁺ за відсутності (1) та у присутності (2) аналога місячного ґрунту (2 мг/мл)

концентрацією Na⁺. Встановлено, що за цих умов аналог місячного ґрунту викликав статистично вірогідне збільшення зв'язування L-[¹⁴C]глутамату в нервових закінченнях (рис. 4). Зміни зв'язування L-[¹⁴C]глутамату впливають на визначене значення початкової швидкості Na⁺-залежного транспорту L-[¹⁴C]глутамату, за рахунок чого спостерігалось помітне збільшення початкової швидкості у присутності аналога місячного ґрунту. Збільшення зв'язування глутамату може змінити позаклітинний рівень нейромедіатора 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, який є вкрай важливим для синаптичної передачі у мозку, за таких умов може бути порушено.

Наші дані також представляють інтерес з точки зору мембранології. Неясно, який тип взаємодії відбувається між частинками аналога 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 аналога місячного ґрунту. Ми припустили, що це може бути пов'язано з деякими особливостями аналога місячного ґрунту у порівнянні з іншими частинками. Місячний пил складається з аглютинатів з гострими зубчастими краями, які можуть більш

ефективно взаємодіяти з поверхнею мембрани та викликати патологічні зміни. Крім того, місячний пил має значну реакційну поверхню, високий вміст металічного заліза та велику площу поверхні за рахунок пористості. Ми припустили, що збільшення зв'язування глутамату з нервовими закінченнями у присутності аналога місячного ґрунту може бути пов'язано зі змінами на поверхні плазматичної мембрани.

Складність дослідження впливу місячного ґрунту полягає у тому, що він складається з суміші різних частинок, кожна з яких може діяти на клітини за власним механізмом. Дослідження ранніх нейротоксичних ефектів від вдихання повітря з домішками алюмінію і/або марганцю, показали, що субклінічні неврологічні симптоми і низький рівень фосфоліпід-зв'язувального білка Clara cell protein CC16 можуть бути пов'язані з інтерналізацією іонів алюмінію в ліпідну фракцію епітелію легень, що в свою чергу може допомогти іонам алюмінію подолати гемато-енцефалічний бар'єр [19]. Оксид заліза викликає загибель клітин внаслідок пошкодження мембрани, а кремнезем викликає розвиток запалення без значної загибелі як ракових, так і нормальних клітин [11]. Основні компоненти місячного ґрунту, зокрема FeO, Fe₂O₃, MnO, є, з одного боку, мікроелементами, які необхідні для росту і функції мозку, а з іншого боку — нейротоксичними сполуками з важкими наслідками для здоров'я людини [7]. Таким чином, наявність потенційно токсичних металів у складі місячного ґрунту повинна бути прийнята до уваги при оцінці ризику нейротоксичності.

В місячній екзосфері фізичні та хімічні властивості місячного ґрунту можуть змінюватись під впливом ряду специфічних факторів (підвищена радіація, низька гравітація, ультрафіолет і т. д.). Унікальні особливості місячного ґрунту полягають в особливих умовах його формування при тривалому впливі на нього опромінення у безкисневій атмосфері. Ці особливості обумовлюють високу токсичність місячного ґрунту, яка перевищує токсичність аналогів, що походять з матеріалів, одержаних на Землі [16]. В умовах Місяця пил перебуває у первісному стані, що зберігає реакційну здатність поверхні частинок

[28]. Крім того, властивості ґрунту відрізняються в різних регіонах Місяця 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 [29].

Контакт з частинками ґрунту викликає подразнення і запалення, а стрес, мікрогравітація, ультрафіолет 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 [9, 10]. Обробка альвеолярних макрофагів аналогами місячного та марсіанського ґрунту показала дозозалежне підвищення цитотоксичності, викликане пошкодженням переважно субпопуляції клітин супресорів, що загалом призводить до збільшення співвідношення кількості активаторів (RFD1+) та супресорів (RFD1+7+) [27]. Помітного збільшення відсотка нейтрофілів не спостерігалось в жодній з груп через 4 год після обробки аналогом ґрунту, але виявлялось у всіх оброблених групах після 24 год. Це спостереження вказує на те, що пил не володіє гострою токсичністю, ефект був поступовим, а для нейтрофілів потрібен деякий час для спрямування та накопичення в легенях [25]. За даними [24] гострі наслідки дії ґрунту в легенях вказують на те, що місячний пил є більш токсичним, ніж TiO₂. Під час довгострокових місій збільшиться і тривалість впливу позаземного пилу. В роботі [25] було показано, що при збільшенні тривалості знаходження аналогів місячного та марсіанського ґрунту в легенях від 7 до 90 днів, гострі запальні реакції переходять у хронічне запальне ураження. Ушкодження легень були більш важкими при попередній обробці аналогів ґрунту озоном. Вплив озону на аналог місячного ґрунту був неадитивним [25]. За умов 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 [31]. Внаслідок зменшення осідання частинок пилу за умов мікрогравітації ризик їхнього вдихання збільшується. Частинки, що вдихаються, відкладаються в леге-

нях і можуть зберігатись там протягом тривалого часу [14, 33]. Вдихання частинок різного розміру може негативно впливати на дихальну і серцево-судинну систему внаслідок запалення дихальних шляхів [15]. Запропоновано кілька сигнальних механізмів, які можуть брати участь у реакціях запалення і пов'язані з цитотоксичністю ґрунту. Дослідження залежності концентрація-ефект аналогів місячного ґрунту було проведено на лінії макрофагів мишей mRAW 264.7. Результати показали, що аналог місячного ґрунту в концентрації 50—2000 мкг/мл викликає підвищення експресії індукцибельної NO-синтази [10].

У нашому дослідженні виявилось, що аналог місячного ґрунту спричинює збільшення зв'язування глутамату з ізольованими нервовими закінченнями, що може порушити гомеостаз глутамату в головному мозку, вкрай необхідний для синаптичної передачі. Постійне подразнення частинками ґрунту під час довгострокових місій, запалення, стрес та інші шкідливі фактори, зокрема мікрогравітація, підвищена радіація, ультрафіолет і т. д., можуть посилити шкідливі нейрологічні наслідки. Дослідження аналогів місячного ґрунту може відкрити нові засоби профілактики захворювань шляхом усунення або зменшення нейротоксичних ризиків.

- Abbott N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2000. — **20**. — P. 131—147.
- Borisova T., Himmelreich N. Centrifuge-Induced Hypergravity: [³H]GABA and L-[¹⁴C]glutamate Uptake, Exocytosis and Efflux Mediated by High-Affinity, Sodium-Dependent Transporters // *Adv. Space Res.* — 2005. — **36**. — P. 1340—1345.
- 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. — **59**. — P. 965—975.
- Borisova T., Krisanova N. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions // *Adv. Space Res.* — 2008. — **42**. — P. 1971—1979.
- Borisova T., Krisanova N., Himmelreich N. Exposure of animals to artificial gravity conditions leads to the alteration of the glutamate release from rat cerebral hemispheres nerve terminals // *Adv. Space Res.* — 2004. — **33**. — P. 1362—1367.
- 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. — **56**. — P. 466—478.
- Borisova T., Krisanova N., Sivko R., et al. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport // *Neurochem. Int.* — 2011. — **59**. — P. 272—279.
- Borisova T., Sivko R., Borysov A., Krisanova N. Diverse presynaptic mechanisms underlying methyl-beta-cyclodextrin-mediated changes in glutamate transport // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2010. — **30**. — P. 1013—1023.
- Bourdon J. A., Saber A. T., Jacobsen N. R., et al. Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver // *Part. Fibre. Toxicol.* — 2012. — 9-5.
- 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. — **73**. — P. 623—636.
- Choi S. J., Oh J. M., Choy J. H. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells // *J. Inorg. Biochem.* — 2009. — **103**. — P. 463—471.
- Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Meth. Enzymol.* — 1974. — **31**. — P. 445—452.
- Danbolt N. C. Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.* — 2001. — **65**. — P. 1—105.
- 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. — **103**. — P. 687—695.
- Frampton M. W., Stewart J. C., Oberdorster G., et al. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans // *Environ. Health Perspect.* — 2006. — **114**. — P. 51—58.
- Fubini B., Fenoglio I. Toxic potential of mineral dusts // *Elements.* — 2007. — **3**. — P. 407—414.
- 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. — **2**. — P. 26—36.
- Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells // *Environ. Health Perspect.* — 2005. — **113**. — P. 1555—1560.
- Halatek T., Sinczuk-Walczak H., Rydzynski K. Early neurotoxic effects of inhalation exposure to aluminum and/or manganese assessed by serum levels of phospholipid-binding Clara cells protein // *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* — 2008. — **43**. — P. 118—124.

20. Kao Y. Y., Cheng T. J., Yang D. M. Demonstration of an olfactory Bulb—Brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo // *J. Mol. Neurosci.* — 2012. — **48**. — P. 464—471.
21. Kasatkina L., Borisova T. Impaired Na⁺-dependent glutamate uptake in platelets during depolarization of their plasma membrane // *Neurochem. Int.* — 2010. — **56**. — P. 711—719.
22. 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.* 1822. — 2012. — **1**. — P. 553—1561.
23. Krisanova N., Triakash I., Borisova T. Synaptopathy under conditions of altered gravity: Changes in synaptic vesicle fusion and glutamate release // *Neurochem. Int.* — 2009. — **55**. — P. 724—731.
24. Lam C. W., James J. T., Latch J. N., et al. Pulmonary toxicity of simulated lunar and Martian dusts in mice: II. Biomarkers of acute responses after intratracheal instillation // *Inhal. Toxicol.* — 2002. — **14**. — P. 917—928.
25. Lam C. W., James J. T., McCluskey R., et al. Pulmonary toxicity of simulated lunar and Martian dusts in mice: I. Histopathology 7 and 90 days after intratracheal instillation // *Inhal. Toxicol.* — 2002. — **14**. — P. 901—916.
26. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* — 1986. — **155**. — P. 243—248.
27. Latch J. N., Hamilton R. F. Jr., Holian A., et al. Toxicity of lunar and martian dust simulants to alveolar macrophages isolated from human volunteers // *Inhal. Toxicol.* — 2008. — **20**. — P. 157—165.
28. Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., et al. Toxicity of lunardust // *Planet. and Space Sci.* — 2012. — doi.org/10.1016/j.pss.2012.05.023.
29. Loftus D. J., Rask J. C., McCrossin C. G., Tranfield E. M. The chemical reactivity of lunar dust: from toxicity to astrobiology physics and astronomy // *Earth, Moon, and Planets.* — 2010. — **107**. — P. 95—105.
30. Mikawa M., Kato H., Okumura M., et al. Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for MRI contrast agents // *Bioconjug. Chem.* — 2001. — **12**. — P. 510—514.
31. Morimoto Y., Miki T., Higashi T., et al. [Effect of lunar dust on humans: -lunar dust: regolith-] // *Nihon Eiseigaku Zasshi.* — 2010. — **65**. — P. 479—485.
32. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain // *Inhal. Toxicol.* — 2004. — **16**. — P. 437—445.
33. 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. — **21**. — P. 159—168.
34. Qingnuan L., Yan X., Xiaodong Z., et al. Preparation of (99m)Tc-C(60)(OH)(x) and its biodistribution studies // *Nucl. Med. Biol.* — 2002. — **29**. — P. 707—710.
35. Rehders M., Grosshäuser B. B., Smarandache A., et al. Effects of lunar and mars dust simulants on HaCaT keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts // *Adv. Space Res.* — 2011. — **47**. — P. 1200—1213.
36. Takeda K., Suzuki K. I., Ishihara A., et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems // *J. Health. Sci.* — 2009. — **55**. — P. 95—102.
37. Tarasenko A. S., Sivko R. V., Krisanova N. V., et al. Cholesterol depletion from the plasma membrane impairs proton and glutamate storage in synaptic vesicles of nerve terminals // *J. Mol. Neurosci.* — 2010. — **41**. — P. 358—367.
38. Wallace W. T., Tayler L. A., Liu Y., et al. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring // *Meteorit. Planet. Sci.* — 2009. — **44**. — P. 961—970.
39. Wang H., Wang J., Deng X., et al. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice // *J. Nanosci. Nanotech.* — 2004. — **4**. — P. 1019—1024.
40. Xia T., Kovochich M., Liang M., et al. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways // *ACS Nano.* — 2008. — **2**. — P. 85—96.

Стаття надійшла до редакції 12.12.14

А. Г. Назарова, Н. Г. Позднякова, О. А. Воронова,
А. Ю. Чунихин, М. В. Пискова, А. О. Пастухов,
А. А. Борисов, Н. В. Крисанова, Т. А. Борисова

Институт биохимии им. А. В. Палладина
Национальной академии наук Украины, Киев

ОЦЕНКА БИОМОДУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ И НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ АНАЛОГА ЛУННОГО ГРУНТА

При вдыхании ультрадисперсные частицы лунного грунта задерживаются в носовой полости и дыхательных путях и могут переноситься в центральную нервную систему. Нейротоксический потенциал лунного грунта до сих пор не оценен. Исследование было сосредоточено на анализе влияния аналога лунного грунта на ключевые характеристики глутаматергической нейротрансмиссии, поскольку нарушение гомеостаза глутамата, основного возбуждающего нейромедиатора в центральной нервной системе, является одним из основных аспектов патогенеза многих неврологических заболеваний. Аналог лунного грунта (пыли) (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec, Мэдисон, штат Висконсин, США), а именно фракция наноразмерных частиц, до и после обработки ультразвуком была охарактеризована методом фотонной корреляционной спектроскопии. При использовании меченого L-[¹⁴C]глутамата было показано, что в присутствии аналога лунного грунта возрастает связывание L-[¹⁴C]глутамата с изолированными нервными окончаниями головного мозга крыс (синапсомы) в среде с низкой концентрацией Na⁺, в результате чего регистрируется повышение начальной скорости накопления L-[¹⁴C]глутамата нервными окончаниями на 10 % как у контрольных крыс, так и у тех, что подвергались гравитационной перегрузке. Эффект аналога лунного грунта является уникальным и может привести к изменению внеклеточного уровня глутамата, который крайне важен для синаптической передачи. Лунный грунт может оказывать негативное воздействие на гомеостаз глутамата в центральной нервной системе. Постоянное раздражение от контакта с частицами грунта, особенно при долгосрочных миссиях, а также сопутствующие воспаление, стресс, микрогравитация, повышенная радиация, УФ-облучение могут усилить токсическое воздействие грунта на организм человека.

Ключевые слова: аналог лунного грунта, транспорт глутамата, глутаматергическая нейротрансмиссия, нервные терминалы головного мозга.

A. G. Nazarova, N. G. Pozdnyakova, O. O. Voronova,
O. Yu. Chunihin, M. V. Piskova, A. O. Pastuhov,
A. A. Borysov, N. V. Krisanova, T. O. Borisova

Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ANALYSIS OF BIOMODULATORY PROPERTIES AND NEUROTOXICITY OF LUNAR DUST ANALOGUE

During inhalation, nano-/microsized particles of lunar dust are efficiently deposited in nasal, tracheobronchial, and alveolar regions and transported to the central nervous system. The neurotoxic potential of lunar dust has not yet been assessed. The research was focused on the analysis of the effects of lunar dust analogue on the key characteristics of glutamatergic neurotransmission. Disturbances in glutamate homeostasis contribute to the pathogenesis of major neurological disorders. The average size of particles of lunar dust analogue (JSC-1a, Lunar Soil Simulant, Orbitec, USA) before and after sonication was determined by dynamic light scattering. With the use of radiolabeled L-[¹⁴C]glutamate, it was shown that there is an increase in L-[¹⁴C]glutamate binding to isolated rat brain nerve terminals (synaptosomes) in low [Na⁺] media in the presence of lunar dust analogue that led to an apparent increase in the initial velocity of L-[¹⁴C]glutamate uptake by 10 % in control rats, and those underwent to gravitational overload. Thus, the unique effect of lunar dust analogue to increase glutamate binding to the nerve terminals was shown. This can have deleterious effects on the extracellular glutamate homeostasis in the central nervous system that is extremely important for proper synaptic transmission. During a long-term mission, a combination of constant irritation due to dust particles, inflammation, stress, low gravity and microgravity, radiation, UV, and so on may consequently change the effects of the dust and aggravate neurological consequences.

Key words: lunar soil simulant; glutamate transport; glutamatergic neurotransmission; brain nerve terminals.