

doi: <https://doi.org/10.15407/knit2017.02.032>

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

**А. О. Пастухов, М. В. Дударенко, М. О. Галкін,  
Н. В. Крисанова, А. Г. Назарова, Н. Г. Позднякова, Т. О. Борисова**

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

## **СТВОРЕННЯ ВУГЛЕЦЕВОВМІСНОГО АНАЛОГУ МАРСІАНСЬКОГО ПИЛУ ТА ОЦІНКА ЙОГО ВПЛИВУ НА ТРАНСПОРТ НЕЙРОМЕДІАТОРІВ НЕРВОВИМИ ТЕРМІНАЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

*Вуглець широко поширений в марсіанському пилу, метеоритах і міжзоряному просторі. В рамках даного дослідження розроблено новий вуглецевовмісний аналог марсіанського пилу, який складався з неорганічного аналогу марсіанського пилу, отриманого з вулканічного попелу (JSC, Mars-1A, ORBITEC, США) та вуглецю (наноалмазу). Була проведена оцінка ефекту цього аналогу на ключові характеристики синаптичної нейротрансмісії. Вперше показано, що вуглецевовмісний аналог марсіанського пилу, створений на основі наноалмазів, суттєво знижує початкову швидкість накопичення та збільшує позаклітинний рівень нейромедіаторів L-[<sup>14</sup>C]глутамату та [<sup>3</sup>H]ГАМК (γ-аміномасляної кислоти) в нервових терміналях головного мозку щурів. Ефект вуглецевовмісного аналогу марсіанського пилу пов'язаний виключно з активністю його вуглецевої складової, а не з неорганічними компонентами. Найбільш важливим є те, що вуглецева складова нативного марсіанського пилу може мати шкідливий вплив на позаклітинний гомеостаз нейромедіаторів в ЦНС, що призводить до дисбалансу збудливих/гальмівних сигналів і серйозних неврологічних наслідків. Отже, токсична дія вуглецевих структур у складі марсіанського пилу може бути значно більшою у порівнянні з впливом неорганічної складової.*

**Ключові слова:** аналог марсіанського пилу, транспорт глутамату, транспорт ГАМК, глутаматергічна нейротрансмісія, ГАМК-ергічна нейротрансмісія, нервові терміналі головного мозку.

Щодня на Землю падають тонни вуглецевих молекул у частинках пилу та у метеоритах. Нещодавній nanoSIMS-аналіз вуглецю з Тісінтського марсіанського метеориту надав докази наявності у минулому підземних органічних рідин на Марсі. Наявність органічних речовин, інкапсулованих у внутрішніх лакунах метеориту, наводить на думку про те, що вони утворилися ще до падіння, і це є надійним доказом їхнього марсіанського походження, а не земного забруднення.

Ці органічні речовини можуть бути результатом осадження багатих на органіку рідин біля поверхні Марса [12, 13].

Позаземні пілотовані місії, які включають вихід у відкритий космос, вимагають оцінки ризику токсичності міжзоряного та планетарного пилу. Механізми формування, склад і фізичні властивості планетарного пилу (у тому числі і марсіанського) та його вплив на здоров'я людини, зокрема нейротоксична дія, недостатньо охарактеризовані [12, 13, 15, 19]. Виявилось, що частинки місячного ґрунту сорбуються на скафандрах і потрапляють всередину космічних кораблів [19,

---

© А. О. ПАСТУХОВ, М. В. ДУДАРЕНКО, М. О. ГАЛКІН,  
Н. В. КРИСАНОВА, А. Г. НАЗАРОВА, Н. Г. ПОЗДНЯКОВА,  
Т. О. БОРИСОВА, 2017

20]. Внаслідок прямого контакту з частинками місячного пилу протягом декількох місій «Аполлонів» спостерігалось подразнення очей, дихальних шляхів та шкіри астронавтів. Було продемонстровано, що місячний пил, а також тверді наночастинки є причиною запалення [6, 7], яке, як відомо, може змінювати проникність гематоенцефалічного бар'єру [1]. Нейротоксична дія марсіанського пилу може реалізуватись через інгібування синтезу нейромедіатора, зміну потоку іонів через клітинні мембрани, блокування транспорту нейромедіаторів у нервових закінченнях головного мозку.

Глутамат та  $\gamma$ -аміномасляна кислота (ГАМК) є основними збуджувальним та гальмівним нейромедіаторами у центральній нервовій системі ссавців, що беруть участь у більшості аспектів нормального функціонування мозку. Позаклітинна концентрація глутамату між його квантовим вивільненням зберігається у нормі на низькому рівні, тим самим запобігаючи постійній активації рецепторів глутамату і розвитку ексайтотоксичності [5]. Зміни активності транспортерів глутамату та ГАМК є характерною рисою нейрологічних і нейродегенеративних захворювань, а також супроводжують перебування в умовах зміненої гравітації [4]. Глутаматні та ГАМК-транспортери є інтегральними мембранними білками, функції яких тісно пов'язані з плазматичною мембраною. Висловлено припущення, що марсіанський пил може впливати на плазматичну мембрану завдяки значній реакційній поверхні і пористості. Тривалість дії пилу при довгостроковій місії, особливо у поєднанні з іншими шкідливими для людини факторами, зокрема зміненою гравітацією, радіацією, УФ-опроміненням тощо, може посилити його шкідливий вплив.

У нашому дослідженні оцінку нейротоксичних ризиків для здоров'я від впливу аналогу марсіанського пилу проводили відповідно до рекомендацій з оцінки ризику нейротоксичності (US Environmental Protection Agency, 1998 р., 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). Методологічні підходи передбачали

дослідження *in vitro* безпосереднього впливу аналогу марсіанського пилу на ключові характеристики глутаматергічної та ГАМК-ергічної нейротрансмісії.

Беручи до уваги відомі раніше факти: 1) наявність вуглецю у марсіанських метеоритах [10, 16]; 2) транспорт наночастинок до центральної нервової системи з дихальної системи [17]; 3) значний вплив нанорозмірних компонентів-забруднювачів повітря на центральну нервову систему та 4) експериментальні дані щодо негативного впливу наноалмазів на транспорт глутамату та ГАМК у нервових терміналях, — це дослідження було присвячене створенню вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу та дослідженню його дії на ключові характеристики передачі нервового імпульсу. У дослідженні використовували препарат, який складався з аналогу марсіанського пилу JSC, Mars-1A, збагаченого вуглецевим компонентом — наноалмазами, одержаними методом детонаційного синтезу [18]. Основним питанням роботи було з'ясувати, чи може вуглецевмісний аналог марсіанського пилу призводити до розвитку нейрологічних порушень та порівняти його дію з впливом неорганічного аналогу марсіанського пилу та наноалмазів *per se*. Метою дослідження було проаналізувати вплив вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу на  $\text{Na}^+$ -залежне транспортер-опосередковане накопичення та позаклітинний рівень L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату та [ $^3\text{H}$ ]ГАМК в ізольованих нервових закінченнях головного мозку шурів.

## МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Матеріали.** В роботі були використані такі матеріали та реактиви: NEPES, (N-2-hydroxyethyl-piperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); EDTA, «Calbiochem» (США); фіколл-400, додецилсульфат натрію, амінооксидна кислота; скловолокнові фільтри Whatman GF/C «Sigma» (США); L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамат, сцинтиляційні рідини ACS та OSC, «Amer-sham», (Велика Британія); [ $^3\text{H}$ ]ГАМК, «Perkin Elmer» (США).

Аналог марсіанського пилу JSC, Mars-1A виробництва компанії ORBITEC (Orbital Technologies Corporation, США) був одержаний з родо-

вищ вулканічного попелу, що осідав з повітря та містив (у %):  $\text{SiO}_2$  (34.5),  $\text{TiO}_2$  (3),  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (18.5),  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (19),  $\text{FeO}$  (2.5),  $\text{MnO}$  (0.2),  $\text{MgO}$  (2.5),  $\text{CaO}$  (5),  $\text{Na}_2\text{O}$  (2),  $\text{K}_2\text{O}$  (0.5),  $\text{P}_2\text{O}_5$  (0.7).

Порошки наноалмазів були отримані методом детонаційного синтезу із застосуванням технологій, розроблених в Інституті надтвердих матеріалів ім. В. М. Бакуля НАН України [2, 18].

**Етичні норми.** Всі експерименти були виконані згідно із «Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Протокол № 1 від 19/09-2012).

Дослідження проводили на білих щурах-самцях лінії Wistar. Щурів утримували на стандартному раціоні віварію.

**Виділення синапсом з головного мозку щурів.** Синапсоми виділяли за методом Котмана [8] із незначними модифікаціями. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [14].

**Визначення накопичення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату синапсомами.** Накопичення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату синапсомами визначали так: зразки суспензії з концентрацією протеїну 250 мкг/мл преінкубували 8 хв при 37 °С, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 2 хв. Реакцію ініціювали додаванням суміші L-глутамату та L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату (0.1 мкКі/мл, 251 мКі/ммоль) та інкубували при температурі 37 °С. Аліквоти відбирали через 1, 2 та 10 хв, а потім швидко осаджували у мікроцентрифузі «Eppendorf» (20 с при перевантаженні 10000g). Накопичення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та солюбілізованого в SDS осаду за допомогою сцинтиляційного лічильника «Delta 300» («Tracor Analytic», США) в сцинтиляційній рідині ACS (aqueous counting scintillate — сцинтиляційна рідина для водних зразків) (1.5 мл).

**Визначення вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з синапсомом.** Суспензія синапсомом розводилася стандартним сольовим розчином так, що містила 1 мг протеїну/мл, і після 10 хв преінкубації при 37 °С навантажувалася L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутаматом (500 нМ, 238 мКі/ммол) в кальцієвому стандартному сольовому розчині упродовж 10 хв. Після

цього суспензія синапсомом відмивалася 10 об'ємами стандартного сольового розчину і розводилася до концентрації 1 мг протеїну/мл і відразу використовувалася для визначення вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з синапсомом.

Аліквоти (120 мкл, 25 — 30 мкг навантажених L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутаматом синапсомом), преінкубували 8 хв при 37 °С, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 2 хв. Нестимульоване вивільнення L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату з синапсомом у безкальцієвому середовищі визначали за 6 хв. Суспензію синапсомом швидко осаджували у мікроцентрифузі та центрифугували при перевантаженні 10000g протягом 20 с. Аліквоти надосаду (90 мкл) та солюбілізованого додецилсульфатом натрію осаду (90 мкл) змішували з синтіляційною рідиною ACS (1.5 мл) та визначали радіоактивність за допомогою синтіляційного лічильника «Delta 300». Загальний вміст радіоактивності визначали як суму радіоактивності у аліквоті надосаду та у аліквоті солюбілізованого осаду.

**Визначення накопичення [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синапсомами.** В досліді з акумуляції [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синапсомами стандартний сольовий розчин містив 100 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інгібітора ГАМК-трансамінази, для запобігання утворення метаболітів ГАМК. Концентрація протеїну синапсомом у пробі дорівнювала 200 мкг/мл, об'єм проби складав 0.6 мл. Синапсоми преінкубували 5 хв при 37 °С з аналогом марсіанського пилу, після чого ініціювали процес акумуляції внесенням суміші ГАМК (1 мкМ ГАМК та 50 нМ — 0.2 мКі/мл [ $^3\text{H}$ ]ГАМК). Через 1 та 5 хв аліквоти (0.5 мл) фільтрували через GF/C-фільтри. Фільтри двічі промивали охолодженим стандартним сольовим розчином, висушували та вимірювали рівень радіоактивності у сцинтиляційній рідині OCS в лічильнику «Delta 300».

**Визначення вивільнення [ $^3\text{H}$ ]ГАМК з синапсомом.** Синапсоми (2 мг протеїну/мл) в оксигенованому стандартному сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інкубували 5 хв при 37 °С при наявності  $5 \cdot 10^{-7}$  М (0.1 Кі/мл) [ $^3\text{H}$ ]ГАМК. Після охолодження на льоду суспензію втричі розводили охолодженим сольовим розчином і центрифугували 5 хв при перевантаженні 4000g. Осад суспендували при

температурі 4 °C і концентрації протеїну 1 мг/мл в сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти. Синаптосоми, що акумулювали [<sup>3</sup>H]ГАМК (1 мг протеїну/мл), негайно використовували для вивчення процесів вивільнення ГАМК. Синаптосоми (120 мкл суспензії) преінкубували 8 хв при 37 °C, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 2 хв. Зразки інкубували ще 5 хв, після чого центрифугували у мікроцентрифузі (10000g, 20 с). Рівень радіоактивності вивільненої [<sup>3</sup>H]ГАМК в аліквотах супернатанту (90 мкл) вимірювали в лічильнику «Delta 300» з використанням сцинтиляційної рідини ACS (1 мл на 1 аліквоту). Вміст міченої ГАМК у супернатантах був виражений у відсотках від загального вмісту [<sup>3</sup>H]ГАМК в синаптосомах.

**Статистична обробка результатів.** Результати представлені як середнє  $\pm$  СКВ в *n* незалежних експериментах. Різницю між двома групами перевіряли на значущість за допомогою *t*-критерію Стьюдента при рівні значимості  $P \leq 0.05$ . Статистичну обробку даних, побудову графіків і розрахунки функцій проводили з використанням програми Excel.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Отримання вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу.** Складність вивчення марсіанського пилу (МП) пов'язана з його неоднорідністю, оскільки він є сумішшю часток різного розміру і хімічного складу. Для збільшення кількості нанорозмірних частинок в МП останній піддавався такій процедурі. Суспензію МП у концентрації 2 мг/мл у воді обробляли ультразвуком частоти 22 кГц протягом 1 хв при кімнатній температурі та витримували протягом 2 хв. Коли великі частки осаджувались, осад видаляли, а супернатант використовували в експериментах. Вуглецевий компонент, а саме наноалмази (НА), використовувався для отримання модифікованого вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу. Було отримано препарат з концентрацією 2 мг/мл з ваговим співвідношенням 1:1 неорганічних і вуглецевих компонентів (НА-МП).

Методом динамічного розсіювання світла було проведено аналіз розмірів частинок аналогу мар-

сіанського пилу та синаптосом.

Середній розмір частинок у суспензії аналогу марсіанського пилу у стандартному сольовому розчині, розрахований на основі п'яти вимірювань, кожне протягом 1 хв, становив  $4500 \pm 1000$  нм. Крім того, у препараті аналогу було виявлено фракцію частинок з малим розміром (50–60 нм). Розмір вуглецевого компонента складав від 5 до 50 нм.

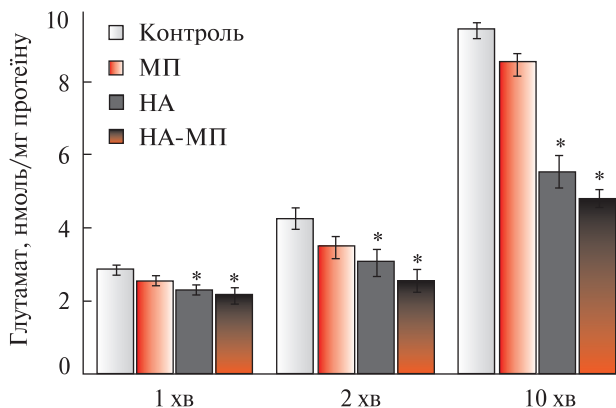
**Експерименти з використанням L-[<sup>14</sup>C]глутамату.** Виявлено, що НА-МП значно знижував початкову швидкість накопичення і акумуляцію L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) протягом 10 хв у синаптосомах (на 25 % і 50 % відповідно). Початкова швидкість дорівнювала  $2.86 \pm 0.15$  нмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну в контрольних синаптосомах і  $2.16 \pm 0.17$  нмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну в синаптосомах при наявності НА-МП. Акумуляція L-[<sup>14</sup>C]глутамату дорівнювала  $9.42 \pm 0.40$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в контрольних синаптосомах і  $4.83 \pm 0.40$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в синаптосомах при наявності НА-МП. Обидва зменшення статистично істотні при  $n = 6$  і рівні значимості  $P \leq 0.05$  (рис. 1).

На протипагу цьому сам МП, доданий до синаптосом, істотно не змінював початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) і його акумуляцію за 10 хв.

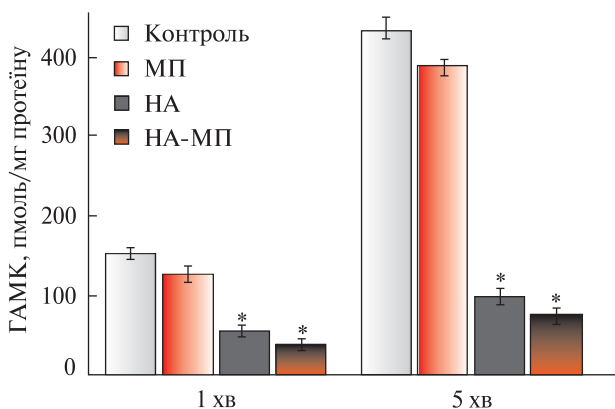
Наноалмази самі по собі було випробувано у наступній серії експериментів. Було показано, що НА зменшують початкову швидкість (на 20 %) і акумуляцію L-[<sup>14</sup>C]глутамату (на 40 %) у синаптосомах. При наявності НА початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату дорівнювала  $2.26 \pm 0.18$  нмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну, а акумуляція за 10 хв —  $5.55 \pm 0.44$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну. Такі зміни також виявляються статистично достовірними при  $n = 6$  і рівні значимості  $P \leq 0.05$  (рис. 1).

Таким чином, НА як складова частина аналогу НА-МП зберегли здатність впливати на накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату.

**Експерименти з використанням [<sup>3</sup>H] ГАМК.** Транспортери ГАМК (а також транспортери біогенних моноамінів і гліцину) належать до іншої родини транспортерів, ніж глутаматні, а саме до родини SLC6, тоді як глутаматні транспортери належать до родини SLC1. Початкова швидкість

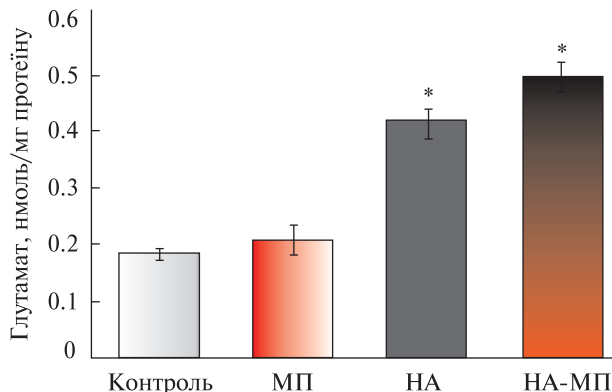


**Рис. 1.** Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами головного мозку впродовж 1, 2, 10 хв при наявності аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2 мг/мл; наноалмазів (НА) у концентрації 2 мг/мл та вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу (НА-МП) у концентрації 2 мг/мл. Зірочками відмічено значення, що суттєво відрізняються від контрольних на рівні значимості  $P \leq 0.05$

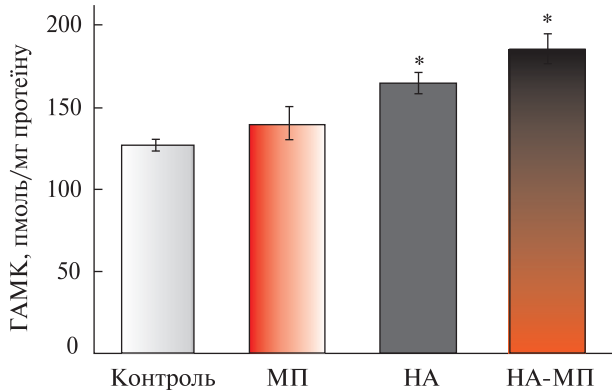


**Рис. 2.** Накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК нервовими терміналами головного мозку впродовж 1 і 5 хв при наявності МП, НА і НА-МП у тих же концентраціях (зірочки — рівень значимості  $P \leq 0.001$ )

накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК і акумуляція [<sup>3</sup>H]ГАМК протягом 5 хв у синаптосомах при наявності НА-МП зменшувалася на 75 % і 80 % відповідно (рис. 2). Початкова швидкість дорівнювала  $149.4 \pm 5.3$  пмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну в контролі і  $38.5 \pm 4.3$  пмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> білка при наявності НА-МП. Акумуляція [<sup>3</sup>H]ГАМК за 5 хв дорівнювала  $432.0 \pm 20.0$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в контрольних синаптосомах і  $73.44 \pm 10.00$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в синаптосомах при наявності НА-МП. Ці зміни суттєві при  $n = 6$  і рівні значимості  $P \leq 0.001$ .



**Рис. 3.** Позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату у синаптосомах після попередньої інкубації з МП, НА і НА-МП у тих же концентраціях (зірочки — рівень значимості  $P \leq 0.001$ )



**Рис. 4.** Те ж для [<sup>3</sup>H]ГАМК (зірочки — рівень значимості  $P \leq 0.05$ )

На відміну від НА-МП, сам МП, доданий до синапсом, істотно не змінював ні початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК, ні її акумуляцію за 5 хв.

Дослідження здатності НА впливати на накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК виявили значне зменшення (на 65 % і 80 %) початкової швидкості накопичення та акумуляції [<sup>3</sup>H]ГАМК синаптосомами, що дорівнювали  $53.71 \pm 5.64$  пмоль·хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну і  $98.5 \pm 10.1$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну ( $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ ) відповідно (рис. 2).

Таким чином, здатність НА впливати на накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК зберігалась навіть тоді, коли вони стали частиною аналогу НА-МП.



**Ефекти НА-МП на позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату і [<sup>3</sup>H]ГАМК у препаратах нервових закінчень.** Підтримка певного позаклітинного рівня глутамату і ГАМК є дуже важливою для синаптичної передачі, тому що зміни в цьому рівні призводять до дисбалансу збуджувальних/гальмівних сигналів і викликають серйозні нейрологічні наслідки. Позаклітинний рівень нейромедіаторів визначається як баланс між їхнім накопиченням та вивільненням. Зниження накопичення нейромедіаторів призводить до збільшення їхнього позаклітинного рівня, однак спостерігаються і деякі винятки.

**Експерименти з використанням L-[<sup>14</sup>C]глутамату.** Як показано на рис. 3, НА і НА-МП викликали значне збільшення (більш ніж удвічі) позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C] глутамату в синаптосомальній суспензії — від  $0.185 \pm 0.010$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в контролі до  $0.415 \pm 0.027$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну і  $0.496 \pm 0.032$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну відповідно ( $P < 0.001$ ,  $n = 6$ ). Один марсіанський пил не впливав на цей параметр, який дорівнював  $0.208 \pm 0.021$  нмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну (рис. 3).

Таким чином, НА-МП значно збільшував позаклітинний рівень L-[<sup>14</sup>C]глутамату в синаптосомальній суспензії, і цей ефект реалізовувався внаслідок впливу НА.

**Експерименти з використанням [<sup>3</sup>H]ГАМК.** У цій серії експериментів позаклітинний рівень [<sup>3</sup>H]ГАМК оцінювався у препараті синаптосом при наявності МП, НА, НА-МП у концентрації 2 мг/мл. Було показано, що сам по собі симулянт МП не призводив до збільшення позаклітинного рівня [<sup>3</sup>H]ГАМК у синаптосомальній суспензії, який дорівнював  $126.55 \pm 3.13$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну в контролі і  $138.47 \pm 13.10$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну при наявності аналога МП (рис. 4).

Так само, як і у експериментах з L-[<sup>14</sup>C]глутаматом, НА і НА-МП значно збільшували (більш ніж на третину) позаклітинний рівень [<sup>3</sup>H]ГАМК у синаптосомальній суспензії, який складав  $163.25 \pm 8.14$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну і  $184.78 \pm 10.33$  пмоль·мг<sup>-1</sup> протеїну відповідно ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (рис. 4).

Таким чином, було встановлено збільшення позаклітинного рівня [<sup>3</sup>H]ГАМК у синаптосомальній суспензії при наявності аналога НА-МП, ефект якого був зумовлений НА.

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Приймаючи до уваги літературні дані щодо широкого поширення вуглецю у марсіанських та інших метеоритах і міжзоряному просторі [10, 16], ми модифікували неорганічний аналог марсіанського пилу, додаючи до нього наноалмази. Розмір частинок наноалмазів становив приблизно 4 нм, отже одна частинка складалася приблизно з 12 тис. атомів вуглецю, з них 3 тис. були поверхневими. Наночастинки утворюються ядром алмазу та поверхневим шаром, що складається з вуглецю з адсорбованими функціональними групами, переважно кисеньвмісними [18].

Наші дослідження були зосереджені на аналізі впливу модифікованого аналога марсіанського пилу, що містив наноалмази (НА-МП) на Na<sup>+</sup>-залежне накопичення глутамату та ГАМК нервовими терміналами головного мозку, яке є одним з найважливіших характеристик глутамат- та ГАМК-ергічної передачі [3, 9, 11]. Ми показали значне зниження початкової швидкості накопичення та акумуляції, а також збільшення позаклітинного рівня L-[<sup>14</sup>C]глутамату (рис. 1, 3) та [<sup>3</sup>H]ГАМК (рис. 2, 4) в нервових терміналях.

Таким чином, вуглецевмісний аналог марсіанського пилу значною мірою впливає на ключові характеристики збуджувальної та гальмівної нейроредатчі, що призводить до порушення балансу між збуджувальними/гальмівними сигналами. Неорганічний компонент аналога марсіанського пилу, оброблений ультразвуком, що містив мінорну фракцію наночастинок розміром 50–60 нм, майже не впливав на накопичення та позаклітинний рівень обох нейромедіаторів у нервових терміналях. Було показано, що ефект вуглецевмісного аналога марсіанського пилу зумовлений переважно його вуглецевою, а не неорганічною складовою. Показано, що аналог марсіанського пилу не спричинює змін мембранного потенціалу, тоді як наноалмази здатні змінювати мембранний потенціал синаптосом. Через це було зроблено припущення, що порушення транспорту нейромедіаторів, спричинені аналогом марсіанського пилу, збагаченого наноалмазами, можуть відбуватися внаслідок хоча б незначної деполіризації мембрани.

Таким чином, збагачення неорганічного аналога марсіанського пилу вуглецевою складовою призводить до виникнення нейротоксичності. З іншого боку, було показано, що неорганічний компонент, а саме аналог марсіанського пилу, не змінює негативного впливу вуглецевого компонента на глутамат- та ГАМК-ергічну нейротрансмісію, а отже, токсична дія вуглецевих структур у складі марсіанського пилу може бути значно більшою у порівнянні з його неорганічними компонентами.

Здатність вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу зменшувати початкову швидкість транспортерзалежного накопичення глутамату та ГАМК, що спричинює значне збільшення позаклітинного рівня обох нейромедіаторів, може розглядатися як ключовий фактор, що зумовлює розвиток нейрологічних порушень. Певна концентрація позаклітинного глутамату та ГАМК врівноважує процеси збудження та гальмування у процесі нейропередачі, а викликане аналогом збільшення позаклітинного рівня обох нейромедіаторів може викликати порушення такої рівноваги.

Таким чином, створено методику виготовлення вуглецевмісного аналога марсіанського пилу та оцінено його токсичний ефект на нервову систему. Показано, що нейротоксичність вуглецевмісного аналогу марсіанського пилу пов'язана виключно з його вуглецевим компонентом, при цьому неорганічна складова пилу залишається інертною.

*Дякуємо за надання препарату наноалмазів О. В. Лещенко, провідному інженеру Інституту надтвердих матеріалів ім. В. М. Бакуля НАН України.*

*Роботу виконано за підтримки Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень на 2012–2016 р. та Державного космічного агентства України.*

1. *Abbott N. J.* Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2000. — **20**. — P. 131–147.
2. *Bogatyreva G. P., Marinich M. A., Oleinik G. S., et al.* The effect of the methods of recovering diamond nanopowders on their physicochemical properties // *J. Superhard Mater.* — 2011. — **33**. — P. 208–216.
3. *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.
4. *Borisova T. A., Krisanova N. V.* Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions // *Adv. Sp. Res.* — 2008. — **42**. — P. 1971–1979.
5. *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.
6. *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**. — P. 5.
7. *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. 623–626.
8. *Cotman C. W.* Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Methods Enzymol.* — 1974. — **31**. — P. 445–452.
9. *Danbolt N. C.* Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.* — 2001. — **65**. — P. 1–105.
10. *Garai J., Haggerty S. E., Rekhi S., Chance M.* Infrared absorption investigations confirm the extraterrestrial origin of carbonado diamonds // *Astrophys. J.* — 2006. — **653**. — P. 153–156.
11. *Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L., Borisova T.* Neuroprotection by lowering cholesterol: A decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* — 2012. — 1822. — P. 1553–1561.
12. *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.
13. *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.
14. *Larson E., Howlett B., Jagendorf A.* Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* — 1986. — **155**. — P. 243–248.
15. *Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., et al.* Toxicity of lunar dust // *Planet. Space Sci.* — 2012. — **74**. — P. 57–71.
16. *Lin Y., Goresy A. El, Hu S., et al.* NanoSIMS analysis of organic carbon from the Tissint Martian meteorite: Evidence for the past existence of subsurface organic-bearing fluids on Mars // *Meteorit. Planet. Sci.* — 2014. — **49**. — P. 2201–2218.

17. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain // *Inhal. Toxicol.* — 2004. — **16**. — P. 437–445.
18. Orel V. E., Shevchenko A. D., Bogatyreva G. P., et al. Magnetic characteristics and anticancer activity of a nanocomplex consisting of detonation nanodiamond and doxorubicin // *J. Superhard Mater.* — 2012. — **34**. — P. 179–185.
19. Rehders M., Grosshäuser B. B., Smarandache A., et al. Effects of lunar and mars dust simulants on HaCaT keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts // *Adv. Sp. Res.* — 2011. — **47**. — P. 1200–1213.
20. Wallace W. T., Taylor L. A., Liu Y., et al. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring // *Meteorit. Planet. Sci. Arch.* — 2009. — **44**. — P. 961–970.
8. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.*, **31**, 445–452 (1974).
9. Danbolt N. C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, **65**, 1–105 (2001).
10. Garai J., Haggerty S. E., Rekhi S., Chance M. Infrared absorption investigations confirm the extraterrestrial origin of carbonado diamonds. *Astrophys. J.*, **653**, 153–156 (2006).
11. Krisanova N., Sivko R., Kasatkina L., Borisova T. Neuroprotection by lowering cholesterol: A decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Basis Dis.*, 1822, 1553–1561 (2012).
12. 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.*, **14**, 901–916 (2002).
13. 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.*, **14**, 917–928 (2002).
14. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.*, **155**, 243–248 (1986).
15. Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., et al. Toxicity of lunar dust. *Planet. Space Sci.*, **74**, 57–71 (2012).
16. Lin Y., Goresy A. El, Hu S., et al. NanoSIMS analysis of organic carbon from the Tissint Martian meteorite: Evidence for the past existence of subsurface organic-bearing fluids on Mars. *Meteorit. Planet. Sci.*, **49**, 2201–2218 (2014).
17. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.*, **16**, 437–445 (2004).
18. Orel V. E., Shevchenko A. D., Bogatyreva G. P., et al. Magnetic characteristics and anticancer activity of a nanocomplex consisting of detonation nanodiamond and doxorubicin. *J. Superhard Mater.*, **34**, 179–185 (2012).
19. Rehders M., Grosshäuser B. B., Smarandache A., et al. Effects of lunar and mars dust simulants on HaCaT keratinocytes and CHO-K1 fibroblasts. *Adv. Sp. Res.*, **47**, 1200–1213 (2011).
20. Wallace W. T., Taylor L. A., Liu Y., et al. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring. *Meteorit. Planet. Sci. Arch.*, **44**, 961–970 (2009).

Стаття надійшла до редакції 13.02.17

## REFERENCES

1. Abbott N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **20**, 131–147 (2000).
2. Bogatyreva G. P., Marinich M. A., Oleinik G. S. et al. The effect of the methods of recovering diamond nanopowders on their physicochemical properties. *J. Superhard Mater.*, **33**, 208–216 (2011).
3. 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.*, **59**, 965–975 (2011).
4. Borisova T. A., Krisanova N. V. Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. *Adv. Sp. Res.*, **42**, 1971–1979 (2008).
5. 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.*, **56**, 466–478 (2010).
6. 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.*, **9**, 5 (2012).
7. 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.*, **73**, 623–626 (2010).



А. О. Пастухов, М. В. Дударенко,  
М. А. Галкин, Н. В. Крысанова, А. Г. Назарова,  
Н. Г. Позднякова, Т. А. Борисова

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

#### СОЗДАНИЕ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО АНАЛОГА МАРСИАНСКОЙ ПЫЛИ И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА ТРАНСПОРТ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ НЕРВНЫМИ ТЕРМИНАЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Углерод широко распространен в марсианской пыли, метеоритах и межзвездном пространстве. В рамках данного исследования разработан новый углеродсодержащий аналог марсианской пыли, состоящий из неорганического аналога марсианской пыли, полученного из вулканического пепла (JSC, Mars-1A, ORBITEC, США) и углерода (наноалмазы). Была проведена оценка эффекта этого аналога на ключевые характеристики синаптической нейротрансмиссии. Впервые показано, что углеродсодержащий аналог марсианской пыли, созданный на основе наноалмазов, существенно снижает начальную скорость накопления и увеличивает внеклеточный уровень нейромедиаторов L-[<sup>14</sup>C]глутамата и [<sup>3</sup>H]ГАМК (γ-аминомасляной кислоты) в нервных терминалах головного мозга крыс. Эффект углеродсодержащего аналога марсианской пыли связан исключительно с активностью его углеродной составляющей, а не с неорганическими компонентами. Наиболее важным является то, что углеродный компонент нативной марсианской пыли может оказывать вредное воздействие на внеклеточный гомеостаз нейромедиаторов в ЦНС, что приводит к дисбалансу возбуждающих/ тормозных сигналов и серьезным нейрологическим последствиям. Таким образом, токсическое воздействие углеродных структур в составе нативной марсианской пыли может превышать влияние неорганических компонентов.

**Ключевые слова:** аналог марсианской пыли, транспорт глутамата, транспорт ГАМК, глутаматергическая ней-

ротрансмиссия, ГАМК-эргическая нейротрансмиссия, нервные терминалы головного мозга.

A. O. Pastukhov, M. V. Dudarenko,  
M. O. Galkin, N. V. Krisanova, A. G. Nazarova,  
N. G. Pozdnyakova, T. O. Borisova

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

#### DEVELOPMENT OF CARBON-CONTAINING MARTIAN DUST ANALOGUE AND ASSESSMENT OF ITS EFFECTS ON THE KEY CHARACTERISTICS OF THE SYNAPTIC NEUROTRANSMISSION IN RAT BRAIN NERVE TERMINALS

Carbon is widely distributed in the Martian dust, meteorites and interstellar space. In this study, we prepared carbon-containing Martian dust analogue, which consists of inorganic Martian dust simulant derived from volcanic ash (JSC, Mars-1A, ORBITEC, USA) and carbon (nanodiamonds). The aim of the study was to analyze the effects of carbon-containing Martian dust analogue on the key characteristics of the synaptic neurotransmission. It was shown that the carbon-containing Martian dust analogue enriched with nanodiamonds significantly reduced the initial rate of accumulation and increased extracellular levels of neurotransmitters L-[<sup>14</sup>C] glutamate and [<sup>3</sup>H]GABA (γ-aminobutyric acid) in isolated rat brain nerve terminals. These effects of carbon-containing Martian dust analogue were mainly associated to the activity of its carbon component, but not to inorganic components. So, carbon component of native Martian dust can have deleterious effects on extracellular glutamate and GABA homeostasis in the CNS, and so glutamate- and GABA-ergic neurotransmission, disbalancing excitatory and inhibitory signals. Thus, the toxic effects of carbon structures in native Martian dust, soil, and meteorites for human health may be greater than the effect of the inorganic components.

**Keywords:** Martian dust analogue, glutamate transport, GABA transport, glutamatergic neurotransmission, GABA-ergic neurotransmission, brain nerve terminals.