

doi: <https://doi.org/10.15407/knit2018.02.060>

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

**Н. Г. Позднякова, А. О. Пастухов,  
М. В. Дударенко, М. О. Галкін, Р.В. Сівко, Н. В. Крисанова, Т. О. Борисова**  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, Київ, Україна

## **ЗБАГАЧЕННЯ НЕОРГАНІЧНОГО АНАЛОГУ МАРСІАНСЬКОГО ПИЛУ НОВІТНІМИ КАРБОНОВИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ, ОТРИМАНИМИ ПРИ ЗГОРАННІ КАРБОГІДРАТІВ, ТА ОЦІНКА ЙОГО НЕЙРОТОКСИЧНОСТІ**

*На теперішній час з'ясування механізмів порушення функціонування мозку за умов довготривалих пілотованих космічних місії є пріоритетним напрямом досліджень міжнародних наукових груп та актуальним завданням сучасної космічної біології. Ігнорування відповідних проблем функціонування нервової системи зробить неможливим подальші довготривалі міжпланетні космічні місії. Однією з можливих причин порушень функціонування мозку може бути токсичний вплив планетарного та міжзоряного пилу, склад і властивості якого, а також вплив його на здоров'я людини, зокрема нейротоксична дія, недостатньо досліджені. Вуглець широко поширений у марсіанському пилу і міжзоряному просторі та входить до складу метеоритів. У рамках даного дослідження неорганічний аналог марсіанського пилу (МП) (JSC, Mars-1A, ORBITEC Orbital Technologies Corporation, Медісон, штат Вісконсин, США) був збагачений у різній кількості карбоновими наночастинками (КНЧ), синтезованими при згоранні карбогідратів. МП, збагачений КНЧ (КНЧ-МП), деполаризує плазматичну мембрану нервових терміналей головного мозку щурів, що показано методом флуориметрії з використанням флуоресцентного зонда родаміну 6G. Збільшення вмісту карбонів складової КНЧ-МП супроводжується зростанням деполаризації мембрани. КНЧ-МП 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. Збільшення вмісту КНЧ у складі КНЧ-МП супроводжується більш суттєвим зменшенням початкової швидкості накопичення нейромедіаторів та зростанням їхнього позаклітинного рівня. Тобто, нейротоксичний ефект КНЧ-МП пов'язаний виключно з активністю КНЧ, а не з дією його неорганічної складової. Зниження концентрації КНЧ у складі пилу призводить до зниження його нейротоксичності.*

**Ключові слова:** аналог марсіанського пилу, карбонові наночастинки, мембранний потенціал, L-[<sup>14</sup>C]глутамат, [<sup>3</sup>H]γ-аміномасляна кислота, синаптосоми, нервові терміналі головного мозку.

Важливе значення при плануванні довготривалих пілотованих космічних польотів, зокрема місії на Марс, які включають також вихід у відкритий космос, має всебічна оцінка багатьох ризиків. На теперішній час не викликає сумнівів, що порушення функціонування мозку за умов мікрогравітації становлять реальну проблему при довготривалих пілотованих місіях. Нещодавно у НАСА був

запропонований новий термін — VІІР (visual impairment and intracranial pressure syndrome) для означення синдрому порушення зору та внутрішньочерепного тиску та опису цілої низки симптомів, які спостерігалися у астронавтів після довгострокових місій. Хоча причини синдрому та пов'язані з ним зміни у структурі мозку пов'язують з довготривалим перебуванням в умовах мікрогравітації та підвищенням внаслідок цього внутрішньочерепного тиску, визначення інших причин,

© Н. Г. ПОЗДНЯКОВА, А. О. ПАСТУХОВ, М. В. ДУДАРЕНКО,  
М. О. ГАЛКІН, Р.В. СІВКО, Н. В. КРИСАНОВА, Т. О. БОРИСОВА, 2018

механізмів розвитку та шляхів подолання нейродегенеративних процесів тільки розпочаті [28].

Узагалі, при довготривалих пілотованих космічних місіях однією з можливих причин порушень функціонування мозку може бути токсичність планетарного та міжзоряного пилу, склад і властивості якого, а також вплив на здоров'я людини, зокрема нейротоксична дія, недостатньо досліджені [19, 20, 23, 27]. Відомо, що частинки місячного пилу сорбуються на скафандрах і потрапляють всередину космічних станцій [27, 31]. Внаслідок прямого контакту з частинками місячного пилу протягом декількох місій «Аполлон» спостерігалось подразнення очей, дихальних шляхів та шкіри астронавтів. Було продемонстровано, що місячний пил, а також наночастинки є причиною запалення [7, 10], яке, як відомо, може змінювати проникність гемато-енцефалічного бар'єру [1]. Нейротоксична дія наночастинок може реалізуватись через інгібування синтезу нейромедіатора, зміну потоку іонів через клітинні мембрани, блокування транспорту нейромедіаторів у нервових закінченнях головного мозку.

Метеорити та міжзоряний пил містять від 2 до 10 % вуглецю, який перебуває у різних фізичних формах, включаючи поліциклічні ароматичні карбогідрати (polycyclic aromatic hydrocarbons) і споріднені матеріали та аморфні з незначним вмістом кисню та азоту. Вуглець, можливо, є і у формі гідрогенізованих органічних сполук, судячи з того, що концентрація дейтерію у частинках міжзоряного пилу корелює з концентрацією вуглецю [2].

Аналіз вуглецю з Тісінтського марсіанського метеорита надав докази існування органічних речовин, інкапсульованих у внутрішніх лакунах метеорита [19, 20].

Нещодавно нами були відкриті нові нейромодуючі та нейротоксичні ефекти карбонових наночастинок, синтезованих з  $\beta$ -аланіну [6] та сірковмісного попередника — суміші лимонної кислоти і тіосечовини [4] методом високотемпературного мікрохвильового нагрівання [13, 17].

Карбонові наночастинки (карбонові точки) являють собою нещодавно відкритий клас нанорозмірних сполук [15, 22]. Є різні методи їхнього одержання, найбільш поширеним з яких є піроліз органічних матеріалів під дією мікрохвиль [9, 13,

33]. Карбонові наночастинки у своєму складі поєднують ароматичні та аліфатичні ділянки, що є типовим і для графену, оксиду графену та алмазу. Вони зібрані у пропорціях та з варіаціями поверхневих груп, що залежать від вихідного матеріалу та умов синтезу.

Було показано, що розмір карбонових наночастинок варіює за даними різних досліджень від 1 до 6 нм [14, 30]. Встановлено, що вони можуть поглинатись клітинами, ймовірно, шляхом ендоцитозу [3, 24, 32]. Перенесення КНЧ через клітинну мембрану залежить від температури: інтерналізація не спостерігалась при 4 °С. Всередині клітин КНЧ накопичуються переважно у мембрані і цитоплазмі [8, 15, 29].

Нейротоксична дія КНЧ залежить від їхньої здатності проходити через стінку шлунково-кишкового тракту і проникати через гематоенцефалічний бар'єр. Наразі відомо, що в організмі ссавців нанорозмірні частинки можуть ефективно поглинатись епітелієм носової порожнини, трахеї, бронхів та альвеол за рахунок дифузії і, окрім перерозподілу між різними органами, транспортуватися вздовж сенсорних аксонів нюхового нерва в центральну нервову систему [18, 25, 26]. Нові дані нещодавно проведених епідеміологічних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать про те, що деякі неврологічні захворювання, а саме хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, інсульт і аутизм можуть бути значною мірою пов'язані із забрудненням атмосферного повітря [16].

У цьому контексті КНЧ, перебуваючи у складі пилу, можуть потрапляти до центральної нервової системи та викликати розвиток нейропатологій, які в умовах довгострокових місій можуть стати незворотними.

Таким чином, метою дослідження був аналіз впливу неорганічного аналогу марсіанського пилу, збагаченого новітніми карбоновими наночастинками, які були отримані при згоранні карбогідратів, на ключові характеристики глутаматергічної та ГАМК-ергічної нейротрансмісії, а саме: 1) потенціал плазматичної мембрани нервових закінчень; 2) на  $\text{Na}^+$ -залежне транспортеропосередковане накопичення та позаклітинний рівень L-[ $^{14}\text{C}$ ]глутамату та [ $^3\text{H}$ ]ГАМК в ізольованих нервових закінченнях головного мозку шурів.

В дослідженні був використаний аналог марсіанського пилу JSC, «Mars-1A», який був збагачений карбоновими наночастинками (КНЧ), отриманими при згоранні карбогідратів, а саме цистеїну, за допомогою мікрохвильового нагрівання [13, 17].

## МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Матеріали.** В роботі були використані такі матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); EDTA, «Calbiochem» (США); фіколл-400, додецилсульфат натрію, амінооксипропанова кислота; скловолокно-ві фільтри WhatmanGF/C «Sigma» (США); L-[<sup>14</sup>C]глутамат, сцинтиляційні рідини ACS та OSC, «Amersham», (Велика Британія); [<sup>3</sup>H]ГАМК, «PerkinElmer» (США).

Аналог марсіанського пилу JSC, «Mars-1A» виробництва компанії ORBITEC Orbital Technologies Corporation (Медісон, штат Вісконсин, США) містить (у %): SiO<sub>2</sub> (34.5), TiO<sub>2</sub> (3), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (18.5), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (19), FeO (2.5), MnO (0.2), MgO (2.5), CaO (5), Na<sub>2</sub>O (2), K<sub>2</sub>O (0.5), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0.7).

**Етичні норми.** Всі експерименти були виконані згідно з «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 [11] із незначними модифікаціями. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [21].

**Оцінка мембранного потенціалу синапсом.** Для оцінки мембранного потенціалу ізольованих нервових закінчень був використаний флуоресцентний потенціал-чутливий зонд родамін 6G (Rh 6G). Флуоресцентні виміри проводились на спектрофлуориметрі «Hitachi MPF-4» при довжинах хвиль збудження та емісії λ 528 та λ 551 нм відповідно (ширина щілини 5 нм). В кювету з магнітною мішалкою до суспензії синапсом (кінцева концентрація протеїну 0.15 мг/мл) дода-

вали родамін 6G (кінцева концентрація 0.5 мкМ) та реєстрували зміну інтенсивності флуоресценції зонда до досягнення стаціонарного значення ( $F_t$ ). Потім у кювету додавали аналог марсіанського пилу та реєстрували кінетику вивільнення зонда та новий стаціонарний рівень його флуоресценції. Кількісну оцінку мембранного потенціалу давали, розраховуючи так званий індекс мембранного потенціалу  $F = F_t/F_0$ , де  $F_t$  та  $F_0$  — інтенсивності флуоресценції Rh 6G при наявності та відсутності синапсом.

**Визначення накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсомами.** Накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсомами визначали наступним чином: зразки суспензії з концентрацією протеїну 250 мкг/мл преінкубували 10 хв при температурі 37 °С, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 5 хв. Реакцію ініціювали додаванням суміші L-глутамату та L-[<sup>14</sup>C]глутамату (0.1 мкКі/мл, 251 мКі/ммоль) та інкубували при температурі 37 °С. Аліквоти відбирали через 1 хв і швидко осаджували у мікроцентрифугі «Eppendorf» (20 с при 10 000 g). Накопичення визначали в аліквотах надосаду (100 мкл) та солюбілізованого в SDS осаду за допомогою сцинтиляційного лічильника «Delta 300» («Tracor Analytic», США) в 1.5 мл сцинтиляційної рідини для водних зразків ACS (aqueous counting scintillate).

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

Аліквоти (120 мкл; 25...30 мкг навантажених L-[<sup>14</sup>C]глутаматом синапсом), преінкубували 10 хв при температурі 37 °С, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 5 хв. Нестимульоване вивільнення L-[<sup>14</sup>C]глутамату з синапсом у безкальцієвому середовищі визначали за 6 хв. Суспензію синапсом швидко осаджували

у мікроцентрифузі та центрифугували при 10000 g 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 синаптосомами.** У дослідях з акумуляції [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синаптосомами стандартний сольовий розчин містив 100 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інгібітора ГАМК-трансамінази, для запобігання утворення метаболітів ГАМК. Концентрація протеїну синаптосом у пробі дорівнювала 200 мкг/мл, об'єм проби дорівнював 0.6 мл. Синаптосоми преінкубували 5 хв при температурі 37 °C з аналогом марсіанського пилу, після чого ініціювали процес акумуляції внесенням суміші ГАМК (1 мкМ ГАМК та 50 нМ — 0.2 мкКі/мл [ $^3\text{H}$ ]ГАМК). Через 1 хв аліквоти (0.5 мл) фільтрували через фільтри GF/C. 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 синаптосом.** Синаптосоми (2 мг протеїну/мл) в оксигенованому стандартному сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти, інкубували 5 хв при 37 °C при наявності  $5 \cdot 10^{-7}$  М (0.1 Кі/мл) [ $^3\text{H}$ ]ГАМК. Після охолодження на льоду суспензію утричі розводили охолодженим сольовим розчином і центрифугували 5 хв при 4000 g. Осад суспендували при температурі 4 °C і концентрації протеїну 1 мг/мл в сольовому розчині, який містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти. Синаптосоми, що акумулювали [ $^3\text{H}$ ]ГАМК (1 мг протеїну/мл), негайно використовували для вивчення процесів вивільнення ГАМК. Синаптосоми (120 мкл суспензії) преінкубували 10 хв при 37 °C, потім додавали аналог марсіанського пилу та інкубували 5 хв. Зразки інкубували ще 5 хв, після чого центрифугували у мікроцентрифузі «Eppendorf» (10000 g, 20 с). Рівень радіоактивності вивільненої [ $^3\text{H}$ ]ГАМК в аліквотах супернатанту (90 мкл) вимірювали в лічильнику «Delta 300» з використанням сцинтиляційної

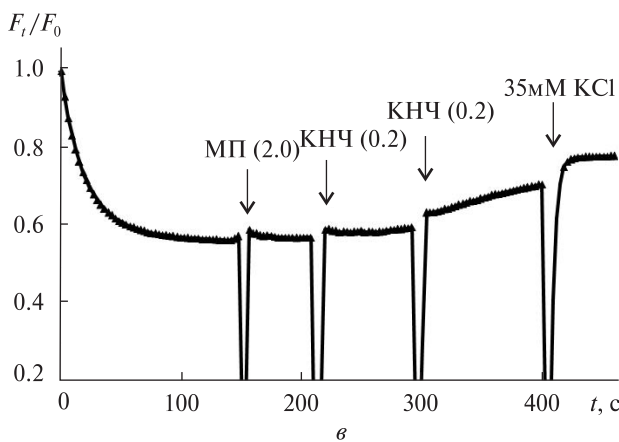
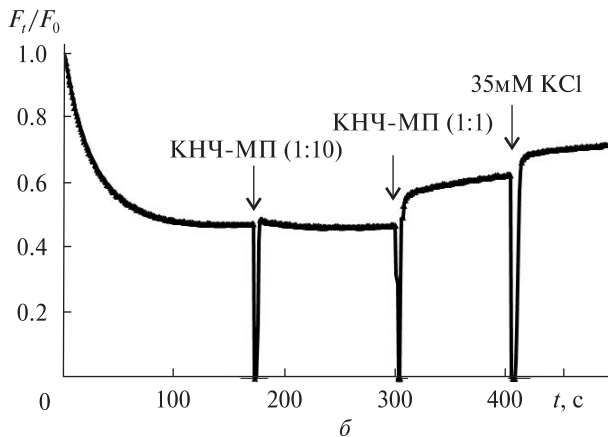
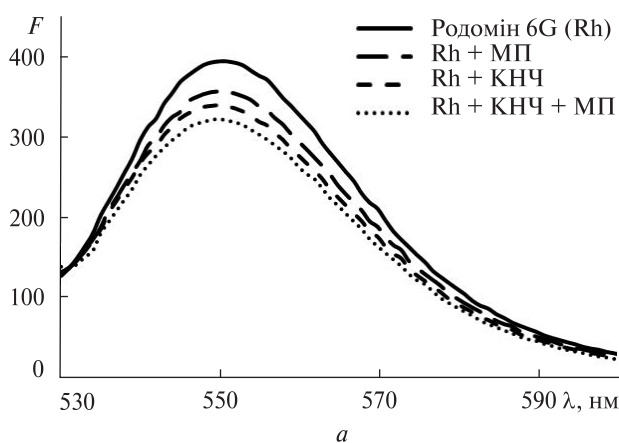
рідини ACS (1 мл на 1 аліквоту). Вміст міченої ГАМК у супернатантах був виражений у відсотках від загального вмісту [ $^3\text{H}$ ]ГАМК у синаптосомах.

**Статистична обробка результатів.** Результати представлено як середнє  $\pm$  S.E.M. в  $n$  незалежних експериментах. Різниця між двома групами порівнювали за допомогою  $t$ -критерію Стьюдента. Різниця вважалася достовірною при  $P \leq 0.05$ . Статистична обробка даних, побудова графіків і розрахунки функцій проводили з використанням програми Excel.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

**Отримання аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, синтезованими шляхом згорання карбогідратів.** Аналог марсіанського пилу (МП) являє собою суміш часток різного розміру і хімічного складу. Для збільшення кількості нанорозмірних частинок суспензію МП у концентрації 2.0 мг/мл у воді обробляли ультразвуком при 22 кГц протягом 1 хв при кімнатній температурі та витримували протягом 2 хв. Коли великі частки осаджувались, осад видаляли і супернатант використовували в експериментах. Для отримання аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, були використані карбонові наночастинки (КНЧ), отримані при згоранні карбогідратів, а саме цистеїну, за допомогою мікрохвильового нагрівання [13, 17]. Було отримано два препарати: 1) з концентрацією 2.0 мг/мл та масовим співвідношенням 1:1 карбонової неорганічної складової (КНЧ-МП 1:1); 2) з концентрацією 0.2 мг/мл та масовим співвідношенням 1:10 карбонової і неорганічної складової (КНЧ-МП 1:10).

**Вплив аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, на мембранний потенціал нервових закінчень.** Мембранний потенціал нервових закінчень є одним з основних параметрів, що визначає нормальне транспортеропосередковане поглинання і позаклітинний рівень нейромедіаторів. Мембранний потенціал ізольованих нервових закінчень вимірювали з використанням флуоресцентного потенціал-чутливого зонду родаміну 6G (Rh 6G). Завдяки тому що



**Рис. 1.** Спектри емісії родаміну 6G (0.5 мкМ) у стандартному сольовому середовищі до і після додавання МП (2.0 мг/мл); КНЧ (2.0 мг/мл); КНЧ-МП (1:1) (а). Вплив КНЧ-МП у співвідношеннях 1:10 та 1:1 на мембранний потенціал синапсом (б). Суспензія синапсом була врівноважена потенційно чутливим зондом родаміном 6G (0.5 мкМ). Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонда до синапсом послідовно додавали КНЧ-МП (1:10) та КНЧ-МП (1:1) (позначено стрілками). Дозозалежний ефект КНЧ на мембранний потенціал синапсом (в). Після досягнення стабільного рівня флуоресценції зонда до синапсом послідовно додавали МП (2.0 мг/мл); КНЧ (0.2 мг/мл); КНЧ-МП (2.0 мг/мл) (позначено стрілками). Кожен графік відображає результати чотирьох незалежних експериментів з різними препаратами синапсом

цей зонд є ліпофільним та катіонним, він легко проходить крізь цитоплазматичний бар'єр і зосереджується у примембранному просторі клітини, згідно із значенням його мембранного потенціалу. За цих умов спостерігається гасіння флуоресценції зонду за рахунок часткового зв'язування з від'ємно зарядженим матриксом синапсом.

На рис. 1, а представлено спектри емісії родаміну 6G (0.5 мкМ) в стандартному сольовому розчині до і після додавання: 1) аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2.0 мг/мл; 2) карбонових наночастинок (КНЧ) у концентрації 2.0 мг/мл; 3) збагаченого карбоновими наночастинками аналогу марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношенні 1:1. Не було виявлено істотних змін у спектрі емісії родаміну 6G у відповідь на додавання зазначених вище препаратів у максимальних концентраціях, однак спостерігалось незначне гасіння флуоресцентного сигналу.

Додавання синапсомальної суспензії до середовища, що містить родамін 6G, супроводжувалося частковим зниженням флуоресценції за рахунок зв'язування зонда з плазматичною мембраною (рис. 1, б). Додавання збагаченого карбоновими наночастинками аналогу марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношенні 1:10 не впливало на інтенсивність флуоресцентного сигналу, однак підвищення вмісту КНЧ (співвідношення 1:1) призводило до зростання сигналу, що свідчило про деполаризацію плазматичної мембрани нервових терміналей (рис. 1, б).

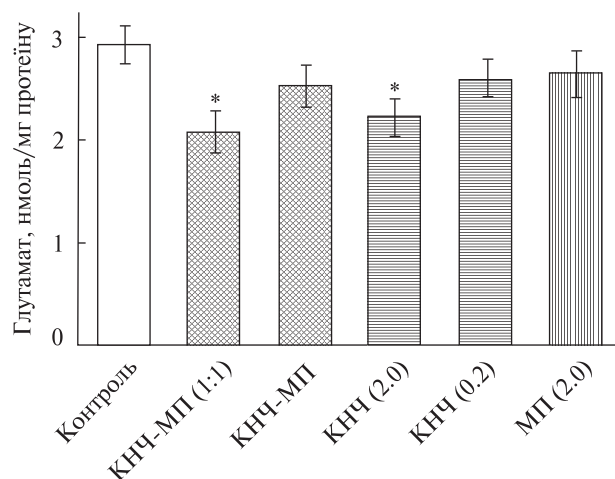
Додавання МП у концентрації 2.0 мг/мл та КНЧ у концентрації 0.2 мг/мл суттєво не впливало на інтенсивність флуоресцентного сигналу (рис. 1, в), що свідчить про відсутність їхнього деполаризаційного впливу на плазматичну мембрану синапсом. Зміни у мембранному потенціалі були зареєстровані лише при підвищенні концен-

трації КНЧ в середовищі інкубації до 2.0 мг/мл. Проте ні КНЧ-МП (1:1), ні КНЧ у концентрації 2.0 мг/мл не впливали на здатність синапсом до відповіді на калієву деполяризацію (додавання 35 мМ КСІ) (рис. 1, в).

**Ефект аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, на транспортерзалежне накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсом.** Ми вивчили вплив аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками (КНЧ-МП), на одну з ключових характеристик глутаматергічної передачі, а саме Na<sup>+</sup>-залежне транспортеропосередковане накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату. Було оцінено початкову швидкість накопичення, яка реєструвалася як акумуляція L-[<sup>14</sup>C]глутамату за першу хвилину процесу. Встановлено, що КНЧ-МП (1:1) значно знижував (на 30 %) початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату (10 мкМ) у синапсосомах. Початкова швидкість дорівнювала  $2.92 \pm 0.19$  нмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну в контрольних синапсосомах і  $2.07 \pm 0.21$  нмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну в синапсосомах у присутності КНЧ-МП (1:1) (рис. 2). На противагу цьому КНЧ-МП у співвідношенні 1:10 не впливав на початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату, яка дорівнювала  $2.53 \pm 0.20$  нмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну. Сам МП, доданий до синапсом у концентрації 2.0 мг/мл, також істотно не змінював початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату, яка складала  $2.64 \pm 0.23$  нмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну.

Таким чином, на відміну від МП самого по собі, КНЧ-МП у співвідношенні 1:1 значно зменшував початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату синапсосомами.

У наступній серії експериментів були випробувані карбонові наночастинки самі по собі. Було виявлено, що КНЧ у концентрації 2.0 мг/мл значно знижували (на 20 %) початкову швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату у синапсосомах. За присутності КНЧ (2.0) початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату дорівнювала  $2.23 \pm 0.18$  нмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну. Однак КНЧ, додані до синапсомальної суспензії у концентрації 0.2 мг/мл, не впливали на акумуляцію L-[<sup>14</sup>C]глутамату, яка складала  $2.58 \pm 0.20$  нмоль · мг<sup>-1</sup> протеїну (рис. 2).

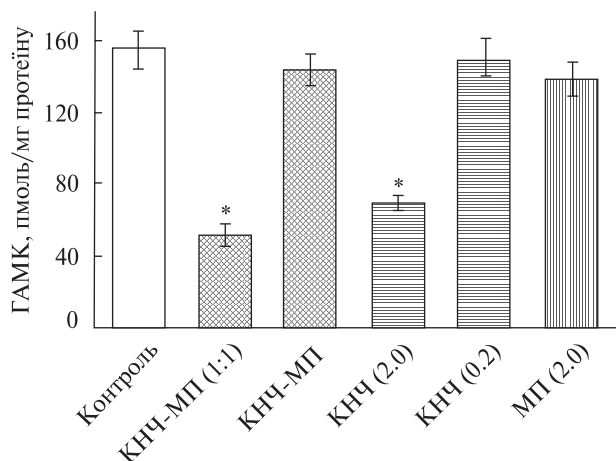


**Рис. 2.** Початкова швидкість накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату нервовими терміналами головного мозку при наявності збагаченого карбоновими наночастинками аналогу марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношеннях 1:1 чи 1:10; карбонових наночастинок (КНЧ) у концентрації 2.0 мг/мл чи 0.2 мг/мл; та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2.0 мг/мл (\* — дані, суттєво відмінні від контрольних при рівні значимості  $P \leq 0.05$ )

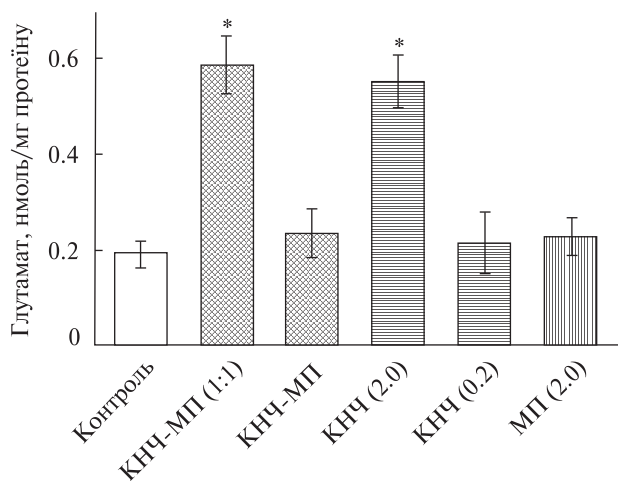
Таким чином, КНЧ як складова частина аналогу КНЧ-МП зберегли здатність впливати на накопичення L-[<sup>14</sup>C]глутамату лише у концентрації 2.0 мг/мл.

**Ефект аналогу марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, на транспортерзалежне накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК синапсосомами.** В наступній серії експериментів нами було досліджено вплив марсіанського пилу, збагаченого карбоновими наночастинками, отриманими з цистеїну, на Na<sup>+</sup>-залежне транспортеропосередковане накопичення міченої тритієм  $\gamma$ -аміномасляної кислоти ([<sup>3</sup>H]ГАМК) синапсосомами головного мозку шурів. Було оцінено початкову швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК, яка реєструвалася як акумуляція за першу хвилину процесу.

Встановлено, що початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК у синапсосомах при наявності КНЧ-МП (1:1) знижувалася на 65 %. У контролі початкова швидкість накопичення [<sup>3</sup>H]ГАМК дорівнювала  $155.18 \pm 10.70$  пмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну, а в присутності КНЧ-МП (1:1) складала  $51.84 \pm 6.62$  пмоль · хв<sup>-1</sup>мг<sup>-1</sup> протеїну (рис. 3). Так само, як і в експериментах з L-[<sup>14</sup>C]глутаматом,



**Рис. 3.** Початкова швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  нервовими терміналами головного мозку при наявності збагаченого карбовоними наночастинками аналогу марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношеннях 1:1 чи 1:10; карбовоних наночастинок (КНЧ) у концентрації 2.0 мг/мл чи 0.2 мг/мл; та аналогу марсіанського пилу (МП) у концентрації 2.0 мг/мл (\* — дані, суттєво відмінні від контрольних при рівні значимості  $P \leq 0.05$ )



**Рис. 4.** Позаклітинний рівень  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$  у синаптосомах після попередньої інкубації із збагаченим карбовоними наночастинками аналогом марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношеннях 1:1 чи 1:10; карбовоними наночастинками (КНЧ) у концентрації 2.0 мг/мл чи 0.2 мг/мл; та аналогом марсіанського пилу (МП) у концентрації 2.0 мг/мл (\* — дані, суттєво відмінні від контрольних при рівні значимості  $P \leq 0.001$ )

КНЧ-МП у співвідношенні 1:10 не впливав на початкову швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ , яка дорівнювала  $143.57 \pm 9.15$  пмоль  $\cdot$  хв $^{-1}$ мг $^{-1}$  протеїну. Сам МП, доданий до синаптосом, істотно не змі-

нював початкову швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ , яка дорівнювала  $138.28 \pm 9.67$  пмоль  $\cdot$  хв $^{-1}$ мг $^{-1}$  протеїну.

Карбовоні наночастинки у концентрації 2.0 мг/мл самі по собі додані до синаптосом, спричиняли значне зменшення (на 55 %) початкової швидкості накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ , яка дорівнювала  $69.46 \pm 4.97$  пмоль  $\cdot$  хв $^{-1}$ мг $^{-1}$  протеїну (рис. 3). При зменшенні концентрації КНЧ до 0.2 мг/мл початкова швидкість накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  суттєво не змінювалася і складала  $148.52 \pm 11.16$  пмоль  $\cdot$  хв $^{-1}$ мг $^{-1}$  протеїну.

Таким чином, здатність КНЧ впливати на накопичення  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  зберігалась у складі КНЧ-МП при співвідношенні складових 1:1 та концентрації КНЧ 2.0 мг/мл.

**Ефекти КНЧ-МП на позаклітинний рівень  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$  і  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  в препаратах нервових закінчень.** Позаклітинний рівень нейромедіаторів встановлюється як баланс між їхнім транспортеромосередкованим накопиченням і тонічним нестимульованим вивільненням [5, 12]. Підтримання належного балансу внутрішньоклітинної/позаклітинної концентрації глутамату і ГАМК та їхнього позаклітинного гомеостазу у центральній нервовій системі важливе для нормального функціонування мозку. Втрата такого балансу призводить до багатьох неврологічних захворювань.

Наступним етапом роботи стало дослідження впливу марсіанського пилу, збагаченого карбовоними наночастинками, отриманими з цистеїну, на позаклітинний рівень  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$  і  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ .

Позаклітинний рівень нейромедіаторів визначали після навантаження синаптосом  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутаматом}$  або  $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$  і їхньої попередньої інкубації протягом 5 хв при температурі 37 °C у стандартному сольовому середовищі, яке містило: 1) аналог марсіанського пилу; 2) карбовоні наночастинки; 3) збагачений карбовоними наночастинками аналог марсіанського пилу.

**Експерименти з використанням  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$ .** Нами було виявлено, що КНЧ-МП (1:1) викликав значне підвищення (більш ніж удвічі,  $P < 0.001$ ) позаклітинного рівня  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$  в суспензії синаптосом (рис. 4). В контролі позаклітинний рівень  $\text{L}-[^{14}\text{C}]\text{глутамату}$  складав  $0.193 \pm$

$\pm 0.030$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну, а при наявності КНЧ-МП (1:1) підвищувався до  $0.587 \pm 0.063$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну ( $P < 0.001$ ,  $t$ -критерій Стьюдента,  $n = 6$ ). КНЧ у концентрації 2.0 мг/мл, додані до синапсом самі по собі, також спричиняли суттєве підвищення позаклітинного рівня L-[ $^{14}$ C]глутамату, який складав  $0.555 \pm 0.049$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну ( $P < 0.001$ ,  $t$ -критерій Стьюдента,  $n = 6$ ). МП сам по собі не впливав на цей параметр, який дорівнював  $0.228 \pm 0.040$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну. Однак додані до синаптосомальної суспензії КНЧ-МП у співвідношенні 1:10 або ж КНЧ у концентрації 0.2 мг/мл не впливали на позаклітинний рівень L-[ $^{14}$ C]глутамату, який складав  $0.236 \pm 0.049$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну і  $0.218 \pm 0.067$  нмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну відповідно (рис. 4).

Таким чином, позаклітинний рівень L-[ $^{14}$ C]глутамату значно підвищувався під впливом КНЧ-МП лише при співвідношенні 1:1, і цей ефект спостерігався за рахунок впливу КНЧ у концентрації 2.0 мг/мл.

#### ЕКСПЕРИМЕНТИ З ВИКОРИСТАННЯМ [ $^3$ H]ГАМК

Було виявлено, що як і у експериментах з L-[ $^{14}$ C]глутаматом, КНЧ-МП (1:1) і КНЧ (2.0 мг/мл) значно підвищували (на 70 %,  $P < 0.05$ ) позаклітинний рівень [ $^3$ H]ГАМК в препараті синапсом, який складав  $133.67 \pm 8.53$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну в контролі,  $229.34 \pm 18.14$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну за наявності КНЧ-МП (1:1) в середовищі інкубації та  $232.48 \pm 17.84$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну за наявності КНЧ (2.0 мг/мл) самих по собі (рис. 5). Проте КНЧ-МП (1:10) і КНЧ (0.2 мг/мл) виявились неефективними і не змінювали позаклітинний рівень [ $^3$ H]ГАМК в препараті синапсом, який складав  $152.26 \pm 9.68$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну і  $153.94 \pm 16.38$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну відповідно. Сам по собі аналог МП (2.0 мг/мл) також не впливав на позаклітинний рівень [ $^3$ H]ГАМК в синаптосомальній суспензії, який дорівнював  $145.17 \pm 14.13$  пмоль  $\cdot$  мг $^{-1}$  протеїну (рис. 5).

Таким чином, було встановлено підвищення позаклітинного рівня [ $^3$ H]ГАМК у синаптосомальній суспензії при наявності аналогу КНЧ-МП у співвідношенні складових 1:1, ефективність впливу якого на нервові терміналі реалізується за рахунок КНЧ лише у концентрації 2.0 мг/мл.

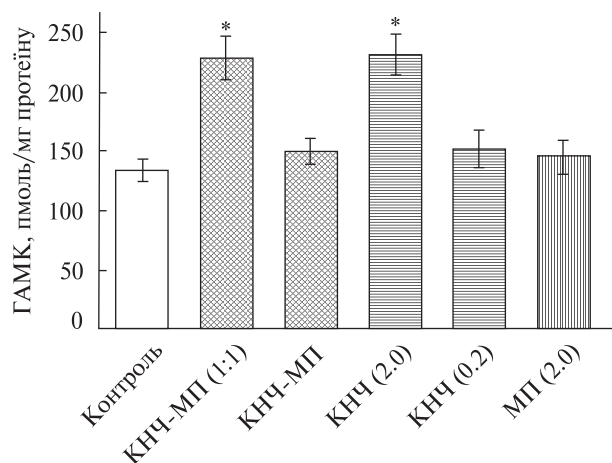


Рис. 5. Позаклітинний рівень [ $^3$ H]ГАМК у синаптосомі після попередньої інкубації із збагаченим карбоновими наночастинками аналогом марсіанського пилу (КНЧ-МП) у співвідношеннях 1:1 чи 1:10; карбоновими наночастинками (КНЧ) у концентрації 2.0 мг/мл чи 0.2 мг/мл; та аналогом марсіанського пилу (МП) у концентрації 2.0 мг/мл (\* — дані, суттєво відмінні від контрольних при рівні значимості  $P \leq 0.05$ )

У даній роботі ми показали значне зниження початкової швидкості накопичення, а також зростання позаклітинного рівня L-[ $^{14}$ C]глутамату та [ $^3$ H]ГАМК в нервових терміналях головного мозку щурів за дії КНЧ-МП. Здатність КНЧ-МП зменшувати швидкість транспортерзалежного накопичення глутамату та ГАМК спричинює зростання позаклітинного рівня обох нейромедіаторів в умовах наявності КНЧ-МП. Збільшення вмісту КНЧ у складі КНЧ-МП супроводжується більш суттєвим зменшенням початкової швидкості накопичення нейромедіаторів та зростанням їхнього позаклітинного рівня.

Певна концентрація позаклітинного глутамату та ГАМК врівноважує процеси збудження та гальмування у процесі нейропередачі. Це може розглядатися як ключовий фактор, що зумовлює розвиток неврологічних порушень. Викликане КНЧ-МП зростання позаклітинного рівня обох нейромедіаторів може викликати порушення такої рівноваги. Тобто, КНЧ-МП значною мірою впливає на ключові характеристики збуджувальної та гальмівної нейропередачі, що може призводити до порушення балансу між збуджувальними/гальмівними сигналами.



Було проведено аналіз нейротоксичної дії КНЧ-МП з різним вмістом КНЧ. Показано, що ефект КНЧ-МП зумовлений переважно його вуглецевою, а не неорганічною складовою. МП сам по собі не спричинює змін мембранного потенціалу, проте КНЧ-МП здатний змінювати мембранний потенціал синапсом. Збільшення вмісту карбонової складової КНЧ-МП супроводжується зростанням деполяризації мембрани. Тобто, порушення транспорту нейромедіаторів, спричинені КНЧ-МП, можуть відбуватися внаслідок деполяризації плазматичної мембрани нервових терміналей. Отже, збагачення неорганічного аналогу марсіанського пилу КНЧ призводить до виникнення нейротоксичності.

Таким чином, нейротоксичність КНЧ-МП пов'язана виключно з його вуглецевим компонентом, а саме КНЧ, при цьому неорганічна складова пилу залишається інертною. Зниження концентрації КНЧ у складі пилу призводить до зниження його нейротоксичності.

*Роботу виконано за підтримки Цільової комплексної програми НАН України з наукових космічних досліджень на 2012—2017 р.*

*Автори вдячні А. Демченку та М. Декалюк за синтез карбонових наночастинок.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Abbott N. J.* Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability // *Cell. Mol. Neurobiol.* — 2000. — **2**. — P. 131–147.
2. *Allamandola L. J., Sandford S. A., Wopenka B.* Interstellar polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon in interplanetary dust particles and meteorites // *Science.* — 1987. — **4810**. — P. 56–59.
3. *Bhunia S. K., Saha A., Maity A. R., et al.* Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes // *Sci. Rep.* — 2013. — **1**. — P. 1473.
4. *Borisova T., Dekaliuk M., Pozdnyakova N., et al.* Harmful impact on presynaptic glutamate and gaba transport by carbon dots synthesized from sulfur-containing carbohydrate precursor // *Environ. Sci. Pollut. Res.* — 2017. — **21**. — P. 17688–17700.
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. — **3**. — P. 466–478.
6. *Borisova T., Nazarova A., Dekaliuk M., et al.* 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. — P. 203–215.
7. *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. — **1**. — P. 5.
8. *Cao L., Wang X., Meziani M. J., et al.* Carbon dots for multiphoton bioimaging // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2007. — **37**. — P. 11318–11319.
9. *Chandra S., Pathan S. H., Mitra S., et al.* Tuning of photoluminescence on different surface functionalized carbon quantum dots // *RSC Adv.* — 2012. — **9**. — P. 3602.
10. *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. Heal. Part A.* — 2010. — **9**. — P. 623–626.
11. *Cotman C. W.* Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions // *Methods Enzymol.* — 1974. — P. 445–452.
12. *Danbolt N. C.* Glutamate uptake // *Prog. Neurobiol.* — 2001. — **1**. — P. 1–105.
13. *Demchenko A. P., Dekaliuk M. O.* Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging // *Methods Appl. Fluoresc.* — 2013. — **4**. — P. 42001.
14. *Dorćcna C. J., Olesik K. M., Wetta O. G., Winter J. O.* Characterization and toxicity of carbon dot-poly(lactic-co-glycolic acid) nanocomposites for biomedical imaging // *Nano Life.* — 2013. — **1**. — P. 1340002.
15. *Esteves da Silva J. C. G., Gonçalves H. M. R.* Analytical and bioanalytical applications of carbon dots // *TrAC Trends Anal. Chem.* — 2011. — **8**. — P. 1327–1336.
16. *Genc S., Zadeoglulari Z., Fuss S. H., Genc K.* The adverse effects of air pollution on the nervous system // *J. Toxicol.* — 2012. — P. 782462.
17. *Jiang J., He Y., Li S., Cui H.* Amino acids as the source for producing carbon nanodots: microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement // *Chem. Commun. (Camb).* — 2012. — **77**. — P. 9634–9636.
18. *Kao Y.-Y., Cheng T.-J., Yang D.-M., et al.* Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for zno nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo // *J. Mol. Neurosci.* — 2012. — **2**. — P. 464–471.
19. *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. — **9**. — P. 917–928.

20. 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. — **9**. — P. 901–916.
21. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the lowry method for protein determination // *Anal. Biochem.* — 1986. — **2**. — P. 243–248.
22. Li H., Kang Z., Liu Y., et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications // *J. Mater. Chem.* — 2012. — **46**. — P. 24230.
23. Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., et al. Toxicity of lunar dust // *Planet. Space Sci.* — 2012. — **1**. — P. 57–71.
24. Luo P. G., Sahu S., Yang S.-T., et al. Carbon “quantum” dots for optical bioimaging // *J. Mater. Chem. B.* — 2013. — **16**. — P. 2116.
25. Mikawa M., Kato H., Okumura M., et al. Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for mri contrast agents // *Bioconjug. Chem.* — 2001. — **4**. — P. 510–514.
26. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats // *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A.* — 2002. — **20**. — P. 1531–1543.
27. Rehders M., Grosshöuser B. B., Smarandache A., et al. Effects of lunar and mars dust simulants on hacat keratinocytes and cho-k1 fibroblasts // *Adv. Sp. Res.* — 2011. — **7**. — P. 1200–1213.
28. Roberts D. R., Albrecht M. H., Collins H. R., et al. Effects of spaceflight on astronaut brain structure as indicated on mri // *N. Engl. J. Med.* — 2017. — **18**. — P. 1746–1753.
29. Sun Y.-P., Zhou B., Lin Y., et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2006. — **24**. — P. 7756–7757.
30. Tao H., Yang K., Ma Z., et al. In vivo nir fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite // *Small.* — 2012. — **2**. — P. 281–90.
31. Wallace W. T., Taylor L. A., Liu Y., et al. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring // *Meteorit. Planet. Sci.* — 2009. — **7**. — P. 961–970.
32. Wang X., Qu K., Xu B., et al. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents // *J. Mater. Chem.* — 2011. — **8**. — P. 2445.
33. Zhai X., Zhang P., Liu C., et al. Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis // *Chem. Commun.* — 2012. — **64**. — P. 7955.
2. Allamandola L. J., Sandford S. A., Wopenka B. Interstellar polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon in interplanetary dust particles and meteorites. *Science*, **4810**, 56–9 (1987).
3. Bhunia S. K., Saha A., Maity A. R., et al. Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Sci. Rep.*, **1**, 1473 (2013).
4. Borisova T., Dekaliuk M., Pozdnyakova N., et al. Harmful impact on presynaptic glutamate and gaba transport by carbon dots synthesized from sulfur-containing carbohydrate precursor. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **21**, 17688–17700 (2017).
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.*, **3**, 466–478 (2010).
6. Borisova T., Nazarova A., Dekaliuk M., et al. Neuro-modulatory 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.*, 203–215 (2015).
7. 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.*, **1**, 5 (2012).
8. Cao L., Wang X., Mezirani M. J., et al. Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J. Amer. Chem. Soc.*, **37**, 11318–11319 (2007).
9. Chandra S., Pathan S. H., Mitra S., et al. Tuning of photoluminescence on different surface functionalized carbon quantum dots. *RSC Adv.*, **9**, 3602 (2012).
10. 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. Heal. Part A*, **9**, 623–626 (2010).
11. Cotman C. W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.*, 445–452 (1974).
12. Danbolt N. C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, **1**, 1–105 (2001).
13. Demchenko A. P., Dekaliuk M. O. Novel fluorescent carbonic nanomaterials for sensing and imaging. *Methods Appl. Fluoresc.*, **4**, 42001 (2013).
14. Dorcéna C. J., Olesik K. M., Wetta O. G., Winter J. O. Characterization and toxicity of carbon dot-poly(lactic-co-glycolic acid) nanocomposites for biomedical imaging. *Nano Life*, **1**, 1340002 (2013).
15. Esteves da Silva J. C. G., Gonçalves H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **8**, 1327–1336 (2011).
16. Genc S., Zadeoglulari Z., Fuss S. H., Genc K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J. Toxicol.*, 782462 (2012).

Стаття надійшла до редакції 21.01.18

## REFERENCES

1. Abbott N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **2**, 131–147 (2000).

17. Jiang J., He Y., Li S., Cui H. Amino acids as the source for producing carbon nanodots: microwave assisted one-step synthesis, intrinsic photoluminescence property and intense chemiluminescence enhancement. *Chem. Commun. (Camb.)*, **77**, 9634–6 (2012).
18. Kao Y.-Y., Cheng T.-J., Yang D.-M., et al. Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for znO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo. *J. Mol. Neurosci.*, **2**, 464–71 (2012).
19. 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.*, **9**, 917–928 (2002).
20. 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.*, **9**, 901–916 (2002).
21. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.*, **2**, 243–248 (1986).
22. Li H., Kang Z., Liu Y., et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *J. Mater. Chem.*, **46**, 24230 (2012).
23. Linnarsson D., Carpenter J., Fubini B., et al. Toxicity of lunar dust. *Planet. Space Sci.*, **1**, 57–71 (2012).
24. Luo P. G., Sahu S., Yang S.-T., et al. Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *J. Mater. Chem. B*, **16**, 2116 (2013).
25. Mikawa M., Kato H., Okumura M., et al. Paramagnetic water-soluble metallofullerenes having the highest relaxivity for mri contrast agents. *Bioconjug. Chem.*, **4**, 510–514 (2001).
26. Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, **20**, 1531–1543 (2002).
27. 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.*, **7**, 1200–1213 (2011).
28. Roberts D. R., Albrecht M. H., Collins H. R., et al. Effects of spaceflight on astronaut brain structure as indicated on mri. *N. Engl. J. Med.*, **18**, 1746–1753 (2017).
29. Sun Y.-P., Zhou B., Lin Y., et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J. Amer. Chem. Soc.*, **24**, 7756–7757 (2006).
30. Tao H., Yang K., Ma Z., et al. In vivo nir fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite. *Small*, **2**, 281–90 (2012).
31. Wallace W. T., Taylor L. A., Liu Y., et al. Lunar dust and lunar simulant activation and monitoring. *Meteorit. Planet. Sci.*, **7**, 961–970 (2009).
32. Wang X., Qu K., Xu B., et al. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents. *J. Mater. Chem.*, **8**, 2445 (2011).
33. Zhai X., Zhang P., Liu C., et al. Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis. *Chem. Commun.*, **64**, 7955 (2012).

Received 21.01.18

Н. Г. Позднякова, А. О. Пастухов, М. В. Дударенко,  
М. А. Галкин, Р. В. Сивко, Н. В. Крысанова, Т. А. Борисова  
Институт биохимии им. А. В. Палладина  
Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

#### ОБОГАЩЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО АНАЛОГА МАРСИАНСКОЙ ПЫЛИ НОВЕЙШИМИ КАРБОНОВЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ПРИ СГОРАНИИ КАРБОГИДРАТОВ, И ОЦЕНКА ЕГО НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ

В настоящее время выяснение механизмов нарушения функционирования мозга в условиях длительных пилотируемых космических миссий является приоритетным направлением исследования международных научных групп и актуальной задачей современной космической биологии. Игнорирование соответствующих проблем функционирования нервной системы делает невозможным дальнейшие длительные межпланетные космические миссии. Одной из возможных причин нарушений функционирования мозга может быть токсическое воздействие планетарной и межзвездной пыли, состав и свойства которой, а также влияние на здоровье человека, в частности нейротоксическое действие, недостаточно исследованы. Углерод широко распространен в марсианской пыли и межзвездном пространстве и входит в состав метеоритов. В рамках данного исследования неорганический аналог марсианской пыли (МП) (JSC, «Mars-1A», ORBITEC Orbital Technologies Corporation, Мэдисон, штат Висконсин, США) был обогащен в разном количестве карбоновыми наночастицами (КНЧ), синтезированными при сгорании карбогидратов. МП, обогащенный КНЧ (КНЧ-МП), деполяризует плазматическую мембрану нервных терминалей головного мозга крыс, что показано методом флуориметрии с использованием флуоресцентного зонда родамина 6G. Увеличение содержания карбоновой составляющей КНЧ-МП сопровождается ростом деполяризации мембраны. КНЧ-МП 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 терминалях. Увеличение содержания КНЧ в составе КНЧ-МП сопровождается более существенным уменьшением начальной скорости накопления нейромедиаторов и ростом их внеклеточного уровня. То есть, нейротоксический эффект КНЧ-МП связан

исключительно с активностью КНЧ, а не с действием его неорганической составляющей. Снижение концентрации КНЧ в составе пыли приводит к снижению его нейротоксичности.

**Ключевые слова:** аналог марсианской пыли; карбоновые наночастицы, мембранный потенциал, L-[<sup>14</sup>C]глутамат, [<sup>3</sup>H]ГАМК; синапсомы, нервные терминалы головного мозга.

*N. G. Pozdnyakova, A. O. Pastukhov, M. V. Dudarenko, M. O. Galkin, R. V. Sivko, N. V. Krisanova, T. O. Borisova*

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

#### ENRICHMENT OF THE INORGANIC ANALOGUE OF MARTIAN DUST WITH THE NOVEL CARBON NANOPARTICLES OBTAINED DURING COMBUSTION OF CARBOHYDRATES AND ASSESSMENT OF ITS NEUROTOXICITY

Nowadays, analysis of the mechanisms of brain malfunctioning under conditions of long-term manned space missions is a priority research area of international scientific groups and an urgent task of modern space biology. Ignoring the problems of the nervous system functioning can make impossible further long-term interplanetary space missions. One of the possible causes of brain impairment can be an exposure to planetary

and interstellar dust, whose composition, properties, and the impact on human health, in particular, neurotoxicity, have not been sufficiently investigated. Carbon is widely distributed in the native Martian dust and interstellar space and is a part of meteorites. In this study, the inorganic analog of Martian dust (MD) (JSC, Mars-1A, ORBITEC Orbital Technologies Corporation, Madison, Wisconsin, USA) was enriched in different amounts by carbon nanoparticles (CNP) synthesized by the combustion of carbohydrates. MD enriched with CNP (CNP-MD) depolarizes the plasma membrane of the rat brain nerve terminals as shown by fluorimetry using a rhodamine 6G fluorescent probe. An increase in the content of the carbon component of the CNP-MD is accompanied by an increase in the depolarization of the membrane. CNP-MD significantly reduces the initial rate of accumulation and increases the extracellular level of the neurotransmitters L-[<sup>14</sup>C] glutamate and [<sup>3</sup>H]GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) in the nerve terminals. An increase of CNP content in CNP-MD is accompanied by a more significant decrease in the initial rate of neurotransmitter uptake and an increase in their extracellular level. Therefore, the neurotoxic effect of CNP-MD is associated exclusively with the CNP activity but not with the action of its inorganic component. A decrease in the CNP content in CNP-MD reduces its neurotoxicity.

**Keywords:** martian dust analogue; carbon nanoparticles, membrane potential, L-[<sup>14</sup>C]glutamate, [<sup>3</sup>H]GABA, synaptosomes, brain nerve terminals.