

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ
01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.
Тел. (044) 234-59-74, Факс (044) 279-63-65

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ НАНО- ТА МІКРОРОЗМІРНИХ ЧАСТИНОК
АДСОРБУВАТИ ВАЖКІ МЕТАЛИ В БІОЛОГІЧНІЙ СИСТЕМІ З
ВИКОРИСТАННЯМ МОДЕЛІ ГОСТРОЇ МЕТАЛ-ІНДУКОВАНОЇ
ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ
(Методичні рекомендації)

Київ 2024

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ
01054, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.
Тел. (044) 234-59-74, Факс (044) 279-63-65

Рекомендовано до друку Вченою радою
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
протокол № 10 від «10» грудня 2024 р.
Голова вченої ради
ім. О.В. Палладіна академік НАН України
Ідентифікаційний код
05417283
Комісаренко С. В.
«__» грудня 2024 р.



ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ НАНО- ТА МІКРОРОЗМІРНИХ ЧАСТИНОК
АДСОРБУВАТИ ВАЖКІ МЕТАЛИ В БІОЛОГІЧНІЙ СИСТЕМІ З
ВИКОРИСТАННЯМ МОДЕЛІ ГОСТРОЇ МЕТАЛ-ІНДУКОВАНОЇ
ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ

(Методичні рекомендації)

Київ 2024

Активация Wlr
Чтобы активировать
раздел "Параметры"

УДК: 577.175.8, 577.25, 621.002.3:661.66, 612.8 : 577 : 57.02 : 502/504: 620.3
Д 70

«Дослідження здатності нано- та мікророзмірних частинок адсорбувати важкі метали в біологічній системі з використанням моделі гострої метал-індукованої ексайтотоксичності» (для магістрантів та аспірантів біологічних та медичних спеціальностей): метод. рекомендації. – К., в-во ФОП Худяков А.О. 2024. –30 с.

Установа – розробник:

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України
(044) 234-90-56

Методичні рекомендації розроблено у рамках виконання проєкту НФДУ
2023.03/0036.

Укладачі:

Крисанова Наталія Валеріївна – к.б.н., с.н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Позднякова Наталія Георгіївна – к.б.н., с.н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України

Борисов Арсеній Андрійович - к.б.н., м.н.с. відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Борисова Тетяна Олександрівна – д.б.н., проф. зав. відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Рецензенти:

д.б.н. Великий М.М. – професор, завідувач відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

к.б.н. Дзюбенко Н.В. – с.н.с., Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Рекомендовано до друку Вченою радою ІБХ ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол № 10 від 10 грудня 2024 р.) і навчально-методичною радою кафедри біології ІБХ ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 8 від 3.12.2024).

©ІБХ НАН України

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	4
Вступ.....	5
1. Отримання ізольованих нервових терміналей (синапсом) з головного мозку шурів та їх характеристика	7
1.1. Характеристика препаратів синапсом методом лазерної кореляційної спектроскопії	11
1.2. Аналіз препаратів синапсом методом проточної цитометрії.....	11
2. Динамічний гомообмін глутамату через плазматичну мембрану нервових терміналей як важлива характеристика їх функціонального стану	12
3. Модель ексайтотоксичності, індукованої важкими металами, на прикладі ртуті. Позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg ²⁺	14
3.1 Зниження дії Hg ²⁺ на позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату в препаратах нервових закінчень класичними відновниками та хелатуючими агентами.....	15
3.2 Вплив нанорозмірних карбонових точок на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю.....	16
3.4 Вплив мікророзмірних нанопористих матеріалів з сухих яблук на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю.....	17
3.4.1. Вплив нефункціоналізованих нанопористих частинок вуглецю із сухих яблук (CCPs) на позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату в препаратах нервових закінчень.....	19
Узагальнення.....	20
Перелік рекомендованої літератури.....	22

Перелік умовних скорочень

ЕДТА – (EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid)

етилендіамінтетраоцтова кислота

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

DTT – дитіотреїтол

HEPES – (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid)

АФК - активні форми кисню

ГАМК – γ -аміномасляна кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ЦНС – центральна нервова система

cuCDs – вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти та сечовини

CCPs - нефункціоналізовані нанопористі частинки вуглецю із сухих яблук

SEM (Standard Error of the Mean) - стандартна помилка середнього

ВСТУП

Постійне зростання числа пацієнтів з нейрологічними захворюваннями становить глобальну і дотепер невирішену проблему сучасного суспільства. Посттравматичний синдром, що виникає у населення під час воєнного стану та воєнних дій, суттєво поглиблює цю проблему. Крім того, воєнні дії призводять до суттєвого підвищення забруднення нейротоксичними металами та концентрації у повітрі нейротоксичних твердих частинок, що у свою чергу також сприяє поширенню вищезазначеної проблеми. Попередження розвитку та успішне лікування нейрологічних захворювань є найактуальнішим науковим завданням, успішне вирішення якого стримується недостатністю фундаментальних та прикладних знань щодо регуляції ключових процесів синаптичної передачі у центральній нервовій системі.

Нейротоксичні метали, забруднювачі навколишнього середовища, такі як Cd, Pb, Hg, відповідно, створюють глобальну проблему для здоров'я мільйонів людей у всьому світі (World Health Organisation, 2007). Pb, Hg та Cd посідають друге, третє та сьоме місце за токсичністю та потенціалом шкідливого впливу на людину згідно рейтингу токсичних речовин і захворювань (ATSDR, 2024). Відомо, що забруднення навколишнього середовища біологічно важливими перехідними металами, такими як Fe та Cu, та/або зміни їхнього гомеостазу сприяють розвитку нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера та Паркінсона. В той же час зв'язок між дисбалансом біологічно важливих перехідних металів у організмі, таких як Fe та Cu, і розвитком нейродегенеративних захворювань нечасто розглядається за умов дії ендогенних нейротоксичних сумішей таких металів при порушенні фізіологічних механізмів їх контролювання.

Ртуть (Hg) є одним із основних глобальних забруднювачів за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я. Ртуть надходить в навколишнє середовище як з природних, так і з антропогенних джерел. Основним джерелом ртуті є її викиди під час спалювання промислового та побутового вугілля, оскільки воно містить ртуть. Цей метал забруднює повітря, ґрунт і поверхневі води та може потрапити в організм людини. Прийнятним тижневим споживанням неорганічної ртуті було встановлено 4 мкг/кг маси тіла. У шлунково-кишковому тракті всмоктування неорганічної ртуті коливалося в межах 10–15 % у дорослих (World Health Organisation, 2017).

Вплив цього металу призводить до серйозних наслідків для здоров'я, однак основні клітинні механізми все ще залишаються нез'ясованими. Неврологічні захворювання та розлади, у тому числі «тривалі» неврологічні ускладнення COVID, є однією з основних причин інвалідності та передчасної смерті в Європі, тоді як їхня етіологія все ще залишається невідомою. Ртуть вражає центральну нервову систему. Вплив неорганічної ртуті пов'язаний із ознаками та симптомами розладів центральної нервової системи, а саме з емоційною лабільністю, делірієм, головним болем, втратою пам'яті, безсонням, анорексією,

втомою, тремором. У дітей внаслідок інтоксикації неорганічною ртуттю розвиваються різноманітні неврологічні ефекти, наприклад затримка розвитку, регресія, поганий сон, емоційні розлади та самоспрямована агресія (World Health Organisation, 2017).

Ртуть може впливати на кілька аспектів глутаматергічного сигналювання. Зниження життєздатності клітин, викликане HgCl_2 , послаблюється антагоністом рецепторів глутамату (N-метил-D-аспартат). Було виявлено, що метилртуть (MeHg) є більш токсичною, ніж HgCl_2 , а також загибель нейронів, спричинена ртуттю, залежить від асоційованої з глутаматом ексайтотоксичності (Engin et al., 2017). Як MeHg , так і HgCl_2 у мікромольних концентраціях збільшують вивільнення та пригнічують поглинання глутамату, послаблюють мітохондріальну активність і знижують рівні АТФ у культурі зернистих клітин мозочка миші (Fonfría et al., 2005). Детальні молекулярні механізми, які лежать в основі індукованої ртуттю глутамат-опосередкованої ексайтотоксичності та дегенерації нейронів, ще не повністю зрозумілі (Engin et al., 2017).

Приймаючи до уваги вищезазначене, можна зробити висновок, що на сьогоднішній день загальновизнаним є зв'язок з одного боку між впливом ксенобіотичних важких металів і біологічно важливих перехідних металів у високих концентраціях, що забруднюють довкілля, або змінами в гомеостазі останніх, та з іншого боку з етіологією/патогенезом нейрологічних розладів і нейродегенеративних захворювань, включаючи хворобу Альцгеймера та Паркінсона (Carmona et al., 2021; Lopes de Andrade et al., 2021).

Розроблення підходів та шляхів подолання токсичного впливу важких металів є складним завданням сучасної біохімії та біотехнології. Новітні нано- та мікрочастинки як з немодифкованою, так і з модифікованою поверхнею є перспективними хелаторами важких металів.

Одним з підходів до синтезування таких частинок–хелаторів є використання «зелених принципів». Відходи сільського господарства є перспективним джерелом для виробництва цих частинок та потребують меншої кількості хімічних реагентів («зелені принципи»). Сільськогосподарські відходи, які накопичуються, завдають шкоди навколишньому середовищу, внаслідок чого зростає потреба їх переробки. Останнім часом зроблені спроби використання таких відходів (Tohamy et al., 2023). Одним із підходів є створення вуглецевих наноматеріалів. В останні роки вуглецеві точки привертають велику увагу завдяки своїм унікальним властивостям, таким як висока біосумісність, низька токсичність, нанорозмірність, тощо. Високоякісні вуглецеві точки можна синтезувати з використанням зеленої біомаси; однак це питання все ще чекає вирішення (Khairol Anuar et al., 2021). Згідно літературних даних на сьогодні зусилля в основному спрямовані на синтез вуглецевих точок, здатних адсорбувати важкі метали, напр. Pb , з водного розчину, що може бути використано для видалення іонів металу зі стічних вод (Tohamy et al., 2023).

При дослідженні здатності синтезованих частинок до хелатування важких металів дуже важливою є диверсифікація «корисної» адсорбційної здатності

синтезованих наноматеріалів до нейротоксичних важких металів від їх «побічної шкідливої» дії на (Ca^{2+}) -індуковане сигналювання.

Дослідження молекулярних механізмів виникнення порушень у збалансованому транспортуванні збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів за нейропатологічних станів та за умов ексайтотоксичності досліджуються з використанням пресинаптичних нервових терміналей головного мозку шурів (синаптосом). З використанням синаптосом можна розробляти комплексні підходи неспецифічного та таргетного нейрокорегування, зокрема шляхом різноспрямованого впливу на процеси збудження та гальмування у пресинапсі. Також можна досліджувати комплексну модуляцію синаптичної передачі в нервових терміналях головного мозку новими агентами для терапії нейропатологій. Препарат синаптосом може бути використаний для дослідження можливостей корегування позаклітинного рівня збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів, екзоцитозу, транспортер-опосередкованого накопичення та вивільнення нейромедіаторів із залученням сучасних нано- та мікророзмірних частинок.

З використанням синаптосом можна розвивати новий, дуже перспективний напрям – нанонейротоксикологію, у рамках якого можна досліджувати функціональний стан системи екзоцитозу, накопичення та вивільнення збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів, спонтанну та симульовану генерацію активних форм кисню у нервових терміналях за дії різних типів нано- та мікрочастинок. Також можна досліджувати молекулярні механізми виникнення порушень транспортування збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів у пресинапсі за умов дії шкідливих екологічних факторів, у тому числі й пов'язаних з воєнними діями, а саме забрудненням нейротоксичними металами.

1. Отримання ізольованих нервових терміналей (синаптосом) з головного мозку шурів та їх характеристика

Комунікацію та інтеграцію всіх процесів життєдіяльності організму здійснює центральна нервова система (ЦНС). Нейротрансмісія – це каскад скоординованих реакцій, центральну роль в яких займають нейромедіатори – низькомолекулярні хімічні сполуки різної природи. Незважаючи на інтенсивні дослідження процесу нейротрансмісії, розуміння всієї сукупності подій в пре- і постсинаптичних частинах синапса у вигляді ланцюгових і розгалужених процесів є недостатнім. Детальне дослідження складного багатостадійного процесу нейротрансмісії є абсолютно необхідним для розвитку фундаментальної нейрохімії, для визначення механізмів розвитку патологічних станів в нервовій системі, а також попередження та лікування останніх (Борисов А. А., 2017).

Взаємодія між двома основними процесами нервової діяльності, а саме збудженням і гальмуванням, є основою складної функціональної організації ЦНС (Рис. 1). Передача сигналу збудження і гальмування відбувається за участю нейромедіаторів. Нейромедіатори забезпечують передачу інформації від одного

нейрона на інший або на ефекторну клітину. Вирішальне значення для нормального функціонування мозку має складна взаємодія між процесами, опосередкованими нейромедіаторами та баланс між збудженням і гальмуванням у мозку. Основною мікроструктурою, що забезпечує передачу інформації від одного нейрону до іншого є синапс (Рис. 2).

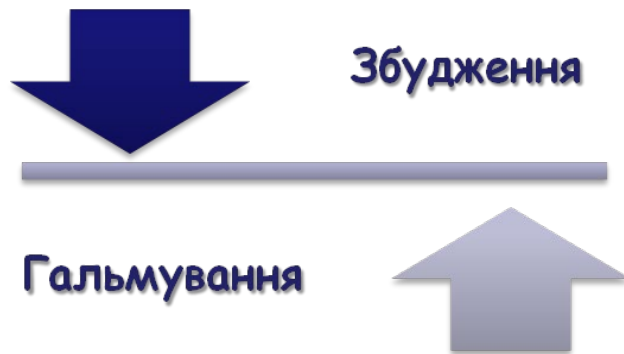


Рис. 1 Нейротрансмісія – це каскад скоординованих реакцій збудження та гальмування.

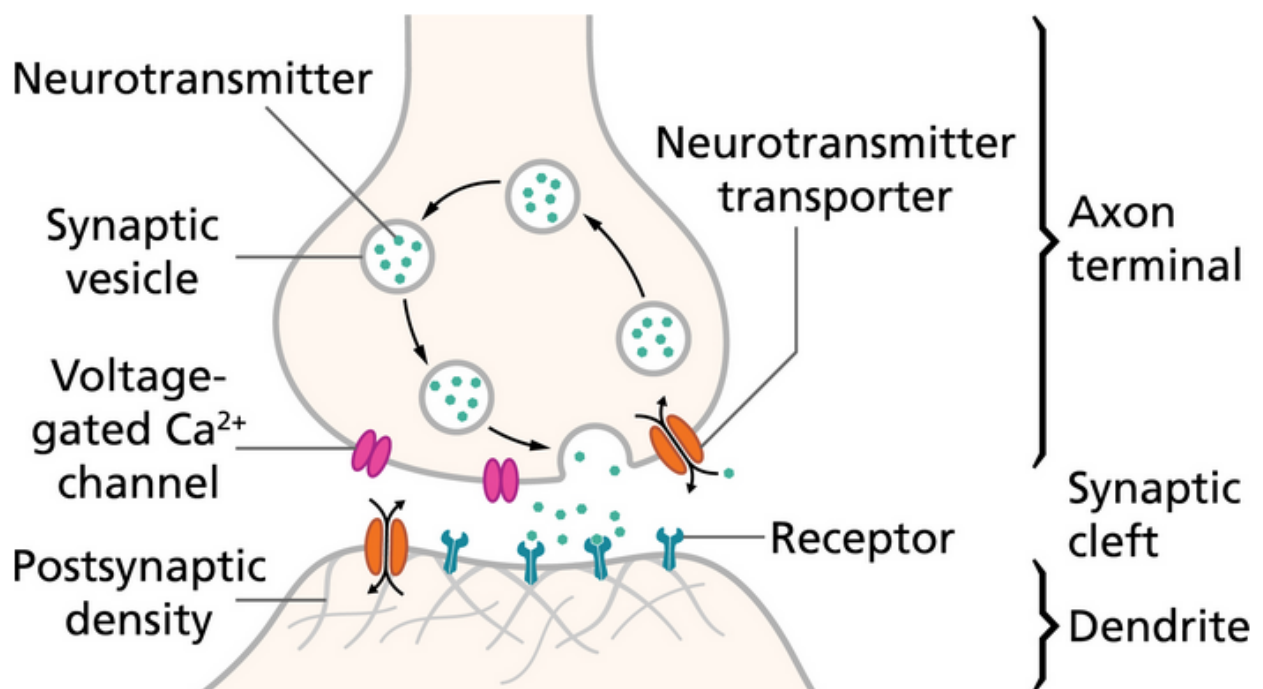


Рис. 2 Структура синапсу (Spletstoeser, 2024)

В основі синаптичної передачі лежать складні транспортні процеси. Комунікація нейронів забезпечується вивільненням нейромедіаторів з пресинаптичних нервових терміналей та їх взаємодією зі специфічними структурами – рецепторами постсинаптичних нейронів. Основним механізмом вивільнення нейромедіаторів з пресинаптичних нервових терміналей є Ca^{2+} -

залежний екзоцитоз, стимульований деполяризацією плазматичної мембрани, а саме злиття синаптичних везикул з плазматичною мембраною. Процес вивільнення нейромедіаторів шляхом екзоцитозу є строго контрольованим і відбувається у відповідь на потенціал дії у пресинапсі. Зміна потенціалу плазматичної мембрани пресинапсу призводить до зміни провідності потенціал-керованих Ca^{2+} каналів, це забезпечує вхід Ca^{2+} з позаклітинного середовища в нервові термінали і, як наслідок, активацію процесу злиття синаптичних везикул з плазматичною мембраною і вивільнення нейромедіаторів в синаптичну щілину (Борисов А. А., 2017).

Впродовж тривалого часу було загальноприйнятим, що підвищення концентрації нейромедіаторів в синаптичній щілині, яке стимулюється потенціалом дії, є виключно наслідком реалізації процесу екзоцитозу, і отже єдиним джерелом нейромедіатора є синаптичні везикули. Але накопичений за останній час експериментальний матеріал свідчить, що під час розвитку патологічних процесів (ішемія, епілепсія), а також при застосуванні нейроактивних фармацевтичних препаратів, процес нейротрансмісії може бути стимульованим за рахунок вивільнення нейромедіаторів з неvesикулярного пулу. Це означає, що транспортери нейромедіаторів плазматичної мембрани можуть не лише активно впливати на етап термінації процесу передачі нейронального сигналу, але і модулювати відповідь постсинаптичного нейрону або виступати в ролі стимулятора процесу нейротрансмісії (Борисов А. А., 2017).

Синаптосоми є однією з найкращих моделей для дослідження пресинаптичних процесів (Sudhof, 2004). Для отримання препарату синаптосом та дослідження транспортування нейромедіаторів використовують наступні матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); EDTA, «Calbiochem» (США); фіколл-400, амінооксиоцтова кислота, компоненти інкубаційного середовища нервових терміналей, сцинтиляційна рідина Sigma-Fluor® High Performance LSC Cocktail, «Sigma» (США); [^3H]ГАМК (γ -[2,3- ^3H (N)]-аміномасляна кислота) та L-[^{14}C]глутамат «Perkin Elmer» (США).

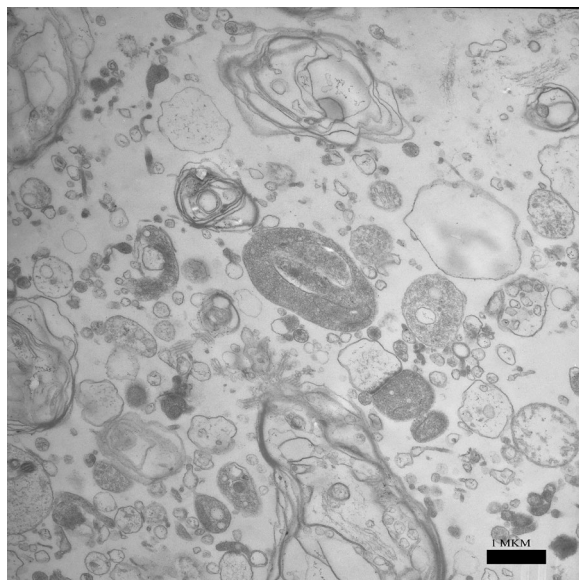
Роботу проводять згідно етичних норм. Експерименти на тваринах проводяться відповідно до Європейських Рекомендацій та Міжнародних Законів/регламенту і інструкцій організацій-виконавців. Всі експерименти виконуються згідно “Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин”, затверджених Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Протокол №1 від 10/01/2024). Дослідження проводяться на білих щурах-самцях лінії Wistar. Щури утримуються на стандартному раціоні віварію.

Виділення синаптосом з головного мозку щурів проводять наступним чином. Синаптосоми виділяють за методом Котмана (1974) (Cotman, 1974). Середовище виділення містить 0,32 М сахарози, 5 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 0,2 мМ EDTA. Гомогенат центрифують при 2,500g 5 хв для відокремлення ядер, кровоносних судин, зруйнованих нервових клітин. Надосадову фракцію центрифугують при 15000 g протягом 12 хв, осаджуючи фракцію неочищених синаптосом. Для

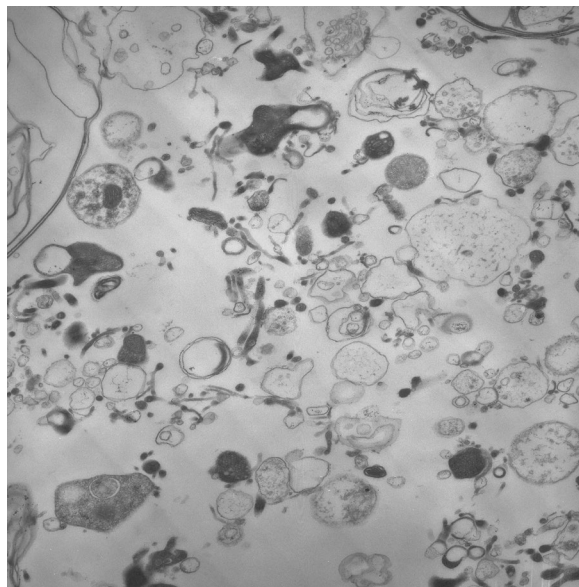
одержання очищеної фракції синапсом попередньо одержаний осад ресуспендують у середовищі виділення та наносять на градієнт фіколли і центрифугують при 70,000 g 45 хв. (Рис. 3). Одержаний осад суспендують в стандартному сольовому розчині, який містить (в мМ): NaCl, 126; KCl, 5; CaCl₂, 1; MgCl₂, 1.4; NaH₂PO₄, 1.0; HEPES-NaOH, 20, pH 7.4; D-glucose, 10.

Концентрацію протеїну визначають за методом Ларсона (Larson et al., 1986) з використанням спектрофотометру Shimadzu UV-1900i.

А



Б



В

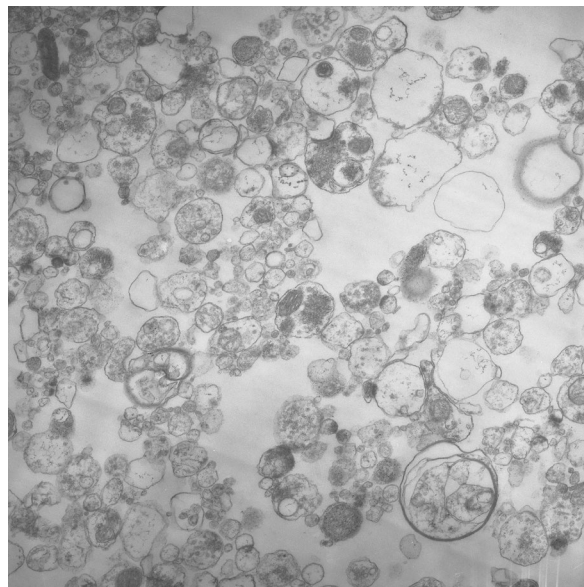


Рис. 3 Електронна мікроскопія препарату нервових терминалей на різних етапах виділення: **А** – гомогенат мозку, **Б** – груба синаптосомальна фракція, **В** – очищена синаптосомальна фракція (Krisanova et al., 2013; Борисов А. А., 2017).

1.1. Характеристика препаратів синаптосом методом лазерної кореляційної спектроскопії

Методом лазерної кореляційної спектроскопії проводять визначення середнього діаметру та функції розподілу за розміром ізольованих нервових терміналей. Визначення проводять за допомогою лазерного кореляційного спектрометру “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Великобританія). Одержані результати вказують, що препарат синаптосом містить частинки розміром від 0,2 до 20 мкм, однак переважна більшість частинок має розміри від 1,5 до 10 мкм, а середній діаметр синаптосом складає $3,24 \pm 0,45$ мкм (Рис. 4).

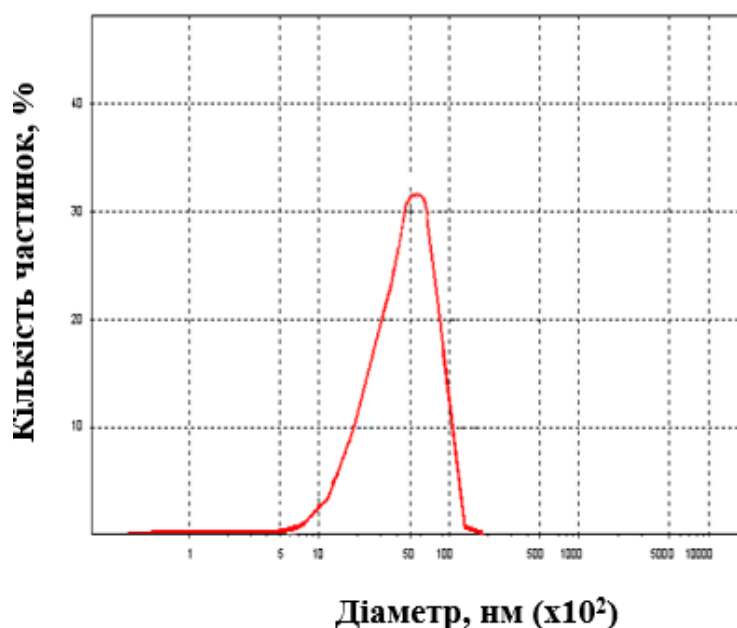


Рис. 4 Розподіл за діаметром частинок препарату синаптосом, одержаний методом лазерної кореляційної спектроскопії. Наведено типовий графік, вимірювання проводили з використанням трьох препаратів синаптосом (Krisanova et al., 2013; Борисов А. А., 2017).

1.2. Аналіз препаратів синаптосом методом проточної цитометрії

Характеристику препаратів синаптосом проводять на проточному цитометрі COULTER EPICS XL. Розмір частинок у препаратах визначають за прямим розсіюванням (FS), а цитоплазматичну гранулярність визначають за бічним розсіюванням (SS). Цитометричні дослідження демонструють характерне положення плями суспензії синаптосом в системі координат FS LOG/SS LOG (Рис. 5). Показник SS є відображенням внутрішньої структури досліджуваних частинок, зокрема, цитоплазматичної гранулярності синаптосом, що зумовлена переважно розміром та кількістю синаптичних везикул в нервовому закінченні. Показник FS характеризує розмір синаптосом (Крисанова Н. В., 2011).

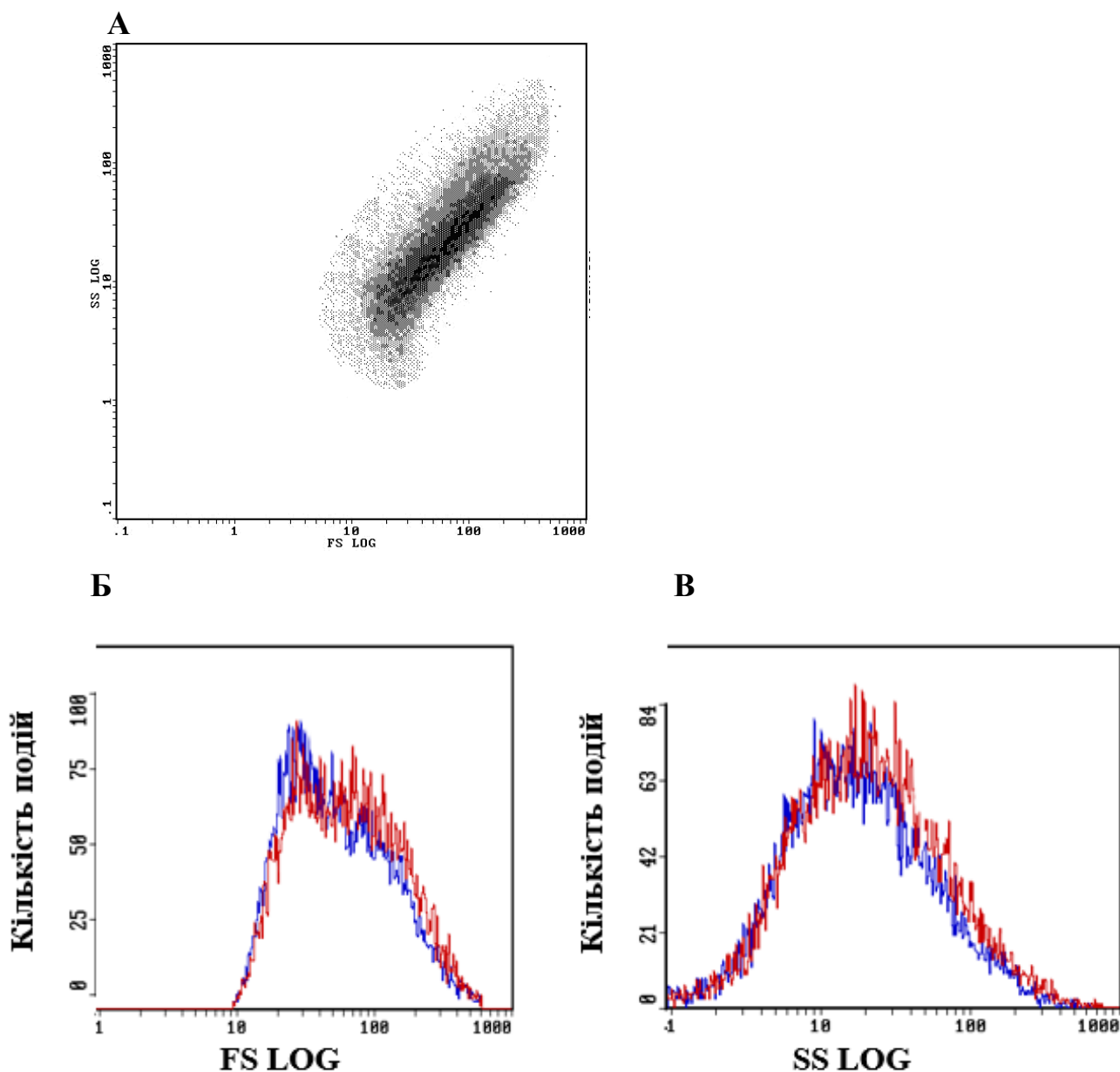


Рис. 5 Аналіз препаратів синапсом методом проточної цитометрії. Гістограма розподілу частинок в системі координат FS LOG/SS LOG для синапсом (А). Розподіл частинок за розміром (Б) та гранулярністю (В). Аналіз проведено на 20000 частинок. Усі зразки було проаналізовано з однаковими установками проточного цитометра (Крисанова Н. В., 2011)

2. Динамічний гомообмін глутамату через плазматичну мембрану нервових терміналей як важлива характеристика їх функціонального стану

L-глутамат забезпечує передачу збуджуючих сигналів у центральній нервовій системі тварин (ЦНС). Цей нейромедіатор відіграє значну роль у функціонуванні мозку та бере участь у здійсненні його найважливіших функцій, а саме навчанні та пам'яті. Порушення транспорту глутамату спостерігаються при патологічних станах, за умов більшості нейродегенеративних захворювань. Оскільки надмірна активація глутаматних рецепторів та масивний вхід кальцію

може призвести до загибелі нейронів, у нервовій системі надлишковий позаклітинний глутамат має токсичні властивості. За рахунок потрапляння нейромедіатора всередину нервової клітини відбувається термінація глутаматергічної нейропередачі шляхом видалення його з синаптичної щілини. Оскільки у синаптичній щілині відсутні ферменти, що здатні розщеплювати глутамат, на сьогодні це є єдиним шляхом «нейтралізації» глутамату. Роботою високоафінних натрійзалежних глутаматних транспортерів, що локалізовані у ліпідних рафтах плазматичної мембрани нейронів і гліальних клітинах забезпечується поглинання глутамату нервовими клітинами (Danbolt, 2001). Na^+/K^+ градієнт на плазматичній мембрані є рушійною силою цього процесу. Через везикулярні глутаматні транспортери глутамат транспортується із цитоплазми у синаптичні везикули, причому за рахунок енергії протонного електрохімічного градієнту, що генерується везикулярною H^+ -АТРазою відбувається транспорт глутамату в синаптичні везикули (Borisova and Borysov, 2016; Борисов А. А., 2017; Крисанова Н. В., 2011).

Відповідно до чинної парадигми, основною функцією транспортерів є видалення нейромедіатора, що масово вивільнюється за допомогою екзоцитозу після деполяризації мембрани, та між епізодами екзоцитозу за рахунок тонічних нестимульованих процесів. Своєчасне видалення надлишкового нейромедіатора запобігає надмірному збудженню постсинаптичних глутаматних рецепторів. Позаклітинний рівень глутамату визначається балансом транспортерзалежного поглинання і тонічного вивільнення глутамату (за рахунок дифузії, спонтанного екзоцитозу, цистин-глутаматного обмінника, витоку через аніонні канали, тощо). Однак передбачається, що транспортерзалежне вивільнення глутамату з нервових закінчень може відбуватися тільки при нестачі енергії у клітині. За нестачі енергії у нервових клітинах, а саме за умов гіпоксії, ішемії, інсульту, травми мозку, та ін., глутаматні транспортери працюють у зворотньому режимі (Рис. 6, 7).

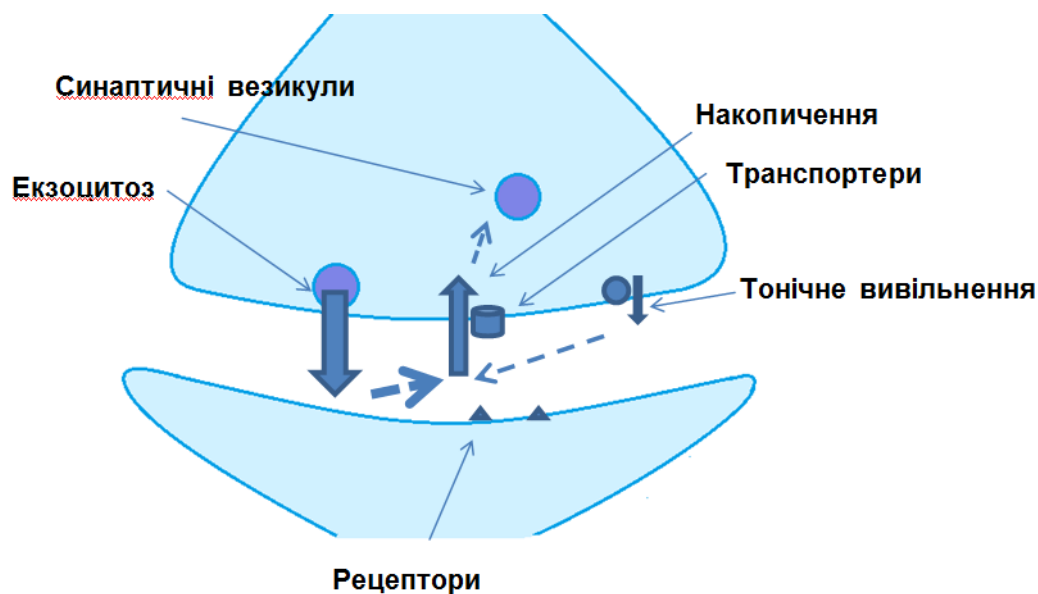


Рис. 6 Поточна парадигма синаптичних подій.

А

Б

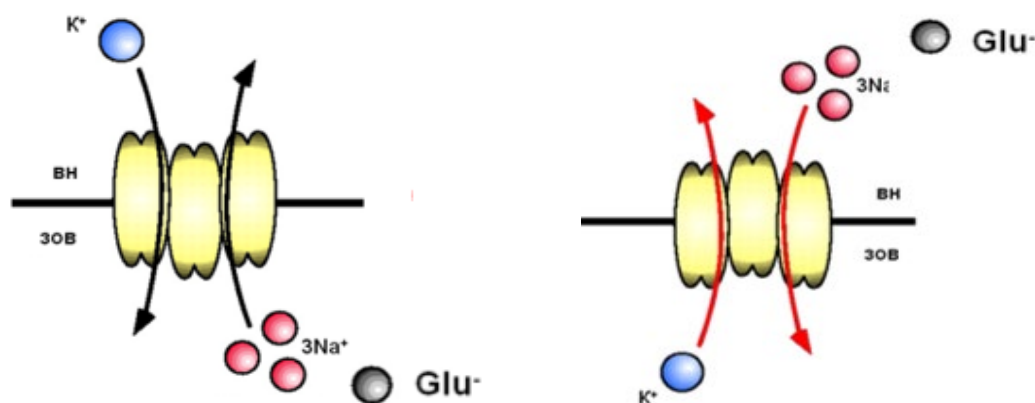


Рис. 7 Функціонування транспортерів глутамату в прямому (А) та зворотньому (Б) напрямках. (Borisova and Borysov, 2016; Krisanova et al., 2013).

Визначення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату у препараті синаптосом визначають наступним чином. Суспензію синаптосом розводять стандартним сольовим розчином до 1 мг протеїну/мл, і після 10 хв преінкубації при 37°C навантажують L-[^{14}C]глутаматом (500 нМ, 238 мСі/ммол) у стандартному сольовому розчині упродовж 10 хв. Аліквоти (120 мкл; 25-30 мкг протеїну / мл навантажених L-[^{14}C]глутаматом синаптосом), преінкубують 8 хв. при 37°C, потім додають аліквоти досліджуваних препаратів та інкубують 10 хв. Нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом у безкальцієвому середовищі визначають за 6 хв. Суспензію синаптосом швидко осаджують в мікроцентрифузі при 10000 g протягом 20 с. Аліквоти надосаду (90 мкл) та солюбілізованого додецилсульфатом натрію осаду (90 мкл) змішують з синтіляційною рідиною Sigma-Fluor® High Performance LSC Cocktail (1,5 мл) та визначають радіоактивність за допомогою синтіляційного лічильника Hidex (N. Krisanova et al., 2024).

Статистичний аналіз даних проводять наступним чином. Результати представляють як середнє $\pm$ SEM в n незалежних експериментах. Різницю між групами порівнюють за допомогою one-way ANOVA. Різницю між групами визначають також за допомогою two-way ANOVA, після чого проводять Tukey's post hoc тест. Різниця вважається значущою при $p < 0,05$. Статистична обробка даних, побудова графіків і розрахунки функцій проводять з використанням програми Excel.

3. Модель ексайтококичності, індукованої важкими металами, на прикладі ртуті. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg^{2+}

Надмірний рівень глутамату в синаптичній щілині провокує ексайтотоксичність і загибель нейронів. Як показано в таблиці 1, Hg^{2+} підвищує позаклітинний синаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату у вузькому інтервалі

концентрацій 1,0 - 20 мкМ від повної відсутності ефекту до його максимального значення. (N. Krisanova et al., 2024).

Таблиця 1 Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg²⁺ у різних концентраціях

Концентрація Hg ²⁺ в інкубаційному середовищі нервових закінчень (мкМ)	Позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату в препаратах нервових закінчень (нмоль/мг протеїну)	F; p-значення
0 (контроль)	0,192 ± 0,006	
1,0	0,196 ± 0,008	F _(1,22) = 0,15; p = 0,69; n.s.
2,5	0,213 ± 0,010	F _(1,22) = 3,46; p = 0,07; n.s.
5,0	0,567 ± 0,024***	F _(1,22) = 249,52; p < 0,001
10,0	0,747 ± 0,021***	F _(1,22) = 735,33; p < 0,001
20,0	0,781 ± 0,023***	F _(1,22) = 655,85; p < 0,001

Дані аналізують за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу one-way ANOVA. Дані є середніми ± SEM. ***, p < 0,001, n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з контролем; n = 12.

3.1 Зниження дії Hg²⁺ на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових закінчень класичними відновниками та хелатуючими агентами

Для перевірки адекватності біологічного підходу для моніторингу змін ефектів Hg²⁺ використовують класичні хелатуючі агенти. Вплив Hg²⁺ на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових закінчень може бути наслідком взаємодії Hg²⁺ з SH-групами мембранних протеїнів, наприклад, транспортерів глутамату. Як показано в таблиці 2, комбіноване застосування 5 мкМ Hg²⁺ і 1 мМ дитіотреїтолу (DTT) (реагент для підтримки SH-груп у відновленому стані) значно зменшує Hg²⁺-опосередковані ефекти.

Таблиця 2 Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових закінчень під час комбінованого застосування Hg²⁺, DTT та EGTA

Концентрації сполук	Позаклітинний рівень L-[¹⁴ C]глутамату в препаратах нервових закінчень (нмоль/мг протеїну)	F; p-значення
0 (контроль)	0,192 ± 0,006	
5 мкМ Hg ²⁺	0,567 ± 0,024***	F _(1,22) = 249,52; p < 0,001
1 мМ DTT	0,202 ± 0,008	F _(1,22) = 1,06; p = 0,31; n.s.
1 мМ DTT and 5 мкМ Hg ²⁺	0,217 ± 0,015###	F _(1,22) = 494,90 p < 0,001
1 мМ EGTA	0,206 ± 0,010	F _(1,22) = 1,48; p = 0,23; n.s.
1 мМ EGTA and 5 мкМ Hg ²⁺	0,211 ± 0,013###	F _(1,22) = 186,36; p < 0,001

Дані аналізують за допомогою two-way ANOVA з наступним Tukey's post hoc тестом для порівняння груп. Дані є середніми ± SEM. ***, p < 0,001, n.s.,

немає достовірних відмінностей порівняно з контролем; ###, $p < 0,001$ порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se*, $n = 12$.

Вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень значно зменшується у присутності 1 мМ етиленглікольбіс(2-аміноетил)тетраоцтової кислоти (EGTA) (хелатоутворювач, який використовується для створення комплексів) (Таблиця 2). Двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) виявляє значну взаємодію між Hg^{2+} і DTT [$F_{(1,44)} = 156$; $p < 0,001$; $n = 12$] і між Hg^{2+} (5 мкМ) і EGTA [$F_{(1,44)} = 170$; $p < 0,001$; $n = 12$].

Отже, DTT і EGTA знижують вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень, і таким чином адекватність моніторингу перевірена (N. Krisanova et al., 2024).

3.2 Вплив нанорозмірних карбонових точок на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю

На основі вищезазначеного підходу оцінюють комбінований вплив вуглецевих точок (cuCDs), синтезованих за допомогою високотемпературної обробки з органічних речовин, а саме з лимонної кислоти та сечовини, та Hg^{2+} на нервові закінчення. Частинки використовують як у низьких ненейротоксичних концентраціях, так і в мінімальних концентраціях, за яких спостерігається суттєвий нейротоксичний вплив на нервові закінчення (N. Krisanova et al., 2024).

CuCDs використовують в концентраціях 1 і 10 мг/мл. Аналіз позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень під час комбінованого застосування cuCDs і Hg^{2+} показує, що вони знижують індуковане Hg^{2+} зростання позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень (Рис. 8).

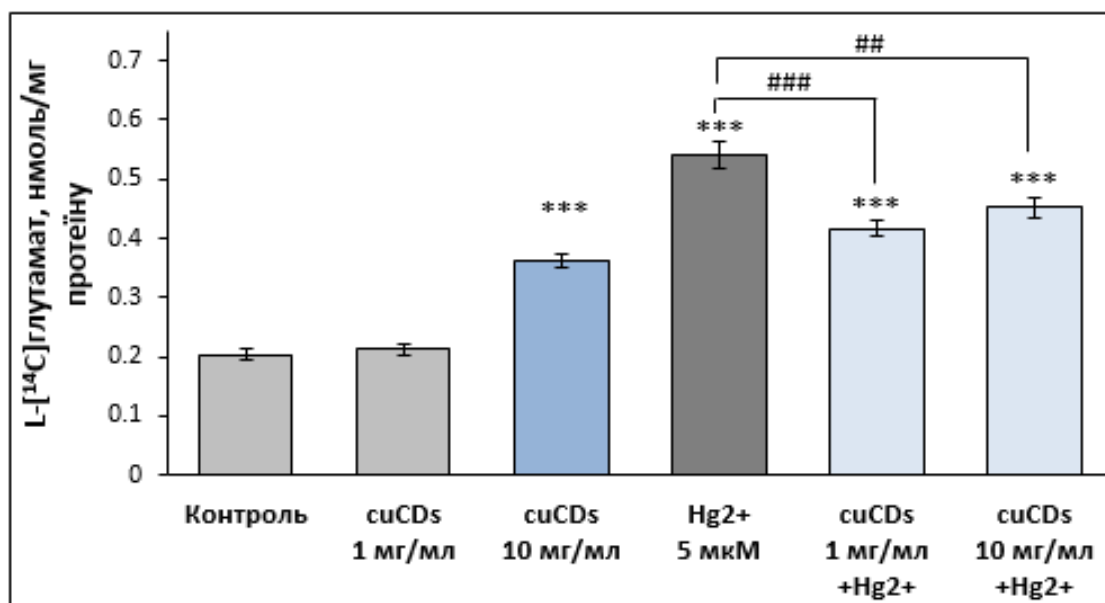


Рис. 8 Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності cuCDs у концентраціях 1 і 10 мг/мл і Hg^{2+} (5 мкМ). Дані

є середніми $\pm$ SEM. Дані аналізували за допомогою two-way ANOVA з наступним Tukey's post hoc тестом. ***, $p < 0,001$, порівняно з контролем; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se*; $n = 12$.

Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень дорівнює $0,416 \pm 0,013$ нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування cuCDs (1 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) (порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se* [$F_{(1,22)} = 24,32$; $p < 0,001$; $n = 12$]) та $0,453 \pm 0,016$ нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування cuCDs (10 мг/мл) та Hg^{2+} (5 мкМ) (порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se* [$F_{(1,22)} = 10,54$; $p < 0,01$; $n = 12$]). Two-way ANOVA виявляє значну взаємодію між Hg^{2+} і cuCDs (1 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 22,3$; $p < 0,001$; $n = 12$] і між Hg^{2+} (5 мкМ) і CuCDs (10 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 63,8$; $p < 0,001$; $n = 12$].

Таким чином, cuCDs володіють здатністю пом'якшувати ексайтотоксичне Hg^{2+} -індуковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень.

Виникло питання, чи можуть cuCDs пом'якшити ексайтотоксичні ефекти інших важких металів? Для підтвердження специфічності пом'якшувальної дії cuCD на індуковане Hg^{2+} підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень останній оцінюють під час комбінованого застосування cuCD та інших нейротоксичних важких металів, зокрема Cd^{2+} .

Показано, що Cd^{2+} у концентрації 300 мкМ підвищує позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препараті синапсом, тоді як cuCDs не пом'якшують Cd^{2+} -індуковане підвищення цього рівня. Останній складає $0,194 \pm 0,012$ нмоль/мг протеїну у контролі; $0,265 \pm 0,021$ нмоль/мг протеїну у присутності Cd^{2+} у концентрації 300 мкМ ([$F_{(1,22)} = 9,18$ $p < 0,01$; $n = 12$]; порівняно з контролем) і $0,276 \pm 0,016$ нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування cuCDs (1 мг/мл) та Cd^{2+} (300 мкМ) ([$F_{(1,22)} = 0,2$ $p = 0,65$; $n = 12$]; порівняно з ефектом Cd^{2+} *per se*). Двофакторний дисперсійний аналіз не виявляє взаємодії між Cd^{2+} і cuCDs [$F_{(1,44)} = 0,08$; $p = 0,76$; $n = 12$]. Таким чином, cuCDs-опосередковане пом'якшення Hg^{2+} -індукованого ефекту на рівень позаклітинного L-[^{14}C]глутамату в препараті синапсом є специфічним, оскільки не виявлено жодних змін у Cd^{2+} -індукованій ексайтотоксичності.

3.4 Вплив мікророзмірних нанопористих матеріалів з сухих яблук на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю

Вуглецеві матеріали (біовугілля), отримані з сільськогосподарчих відходів, є дуже перспективними для застосувань у різних галузях, наприклад, у відновленні навколишнього середовища, в енергетиці, в якості каталізаторів, у сенсориці та біомедицинській практиці (Omar et al., 2024). Попит на пористі вуглецеві наноматеріали зростає, оскільки адсорбція є одним із найефективніших підходів до управління забруднювачами та детоксикації. Вуглецеві матеріали, отримані з відходів сільського господарства, мають пористу структуру та містять функціональні групи, наприклад, карбоксильні чи гідроксильні. Серед широкого

спектру джерел отримання вуглецевих матеріалів сільськогосподарські відходи мають переваги завдяки низькій вартості та відновлюваності. (Dai et al., 2018).

Крім того, важливою особливістю сільськогосподарських відходів як джерела сорбентів є відсутність або дуже низький вміст токсичних компонентів (важких металів, смол, канцерогенних поліконденсованих ароматичних сполук, тощо), що забезпечує у багатьох випадках утворення матеріалів, які не вимагають подальшого очищення для біомедичного використання. Біовугілля можна отримати шляхом піролізу біомаси в різних умовах. Пористі вуглеці, отримані шляхом піролізу та гідротермального піролізу, придатні для обробки стічних вод та адсорбції іонів важких металів (Chen et al., 2020; Dong et al., 2021; Yin et al., 2020). Наприклад, шкірка помело, багата целюлозою та лігніном, широко використовується для синтезу пористих вуглецевих наноматеріалів з великим виходом і численними застосуваннями. Пористі вуглецеві наноматеріали, отримані зі шкірки помело, широко застосовуються як поглиначі завдяки своїй пухкій та пористій структурі та стабільним хімічним властивостям (Liu et al., 2023).

Крім того, біовугілля привертає велику увагу та інтенсивно досліджується через його потенціал у біомедичному застосуванні. Завдяки своїй пористій архітектурі частинки біовугілля можуть стати носіями для наночастинок з іншими функціональними властивостями. Матеріал, отриманий шляхом осадження наночастинок срібла на біовугілля, має антибактеріальні та протипухлинні властивості і такі наночастинки були запропоновані для обробки бактерій і клітин колоректального раку (Alqaraleh et al., 2023). Продемонстровано зміни кишкового мікробіому при застосуванні біовугілля з рисової соломи, які можуть поліпшити його продуктивність завдяки впливу на метаболізм (Han et al., 2019). Досліджено магнітні твердофазні екстракційні матеріали на основі модифікованого біовугілля для вилучення протиепілептичних препаратів із плазми крові. Біовугілля було отримано з оболонки насіння *Zizyphus jujuba*, активовано фосфорною кислотою та намагнічено за допомогою співсаджень. Було показано, що такий матеріал підходить для оцінки протиепілептичних препаратів у плазмі та може бути використаний як екологічно сприятлива матриця для аналізу біологічних зразків (Wang et al., 2024).

Беручи до уваги вищезазначені факти щодо перспективного біомедичного застосування частинок вуглецю з сільськогосподарської біомаси, проводять аналіз нейротоксичних властивостей нефункціоналізованих нанопористих частинок вуглецю із сухих яблук (CCPs). CCPs синтезують з використанням «зелених» принципів із сухих яблук та використовують в біологічних експериментах без попередньої функціоналізації. Нейротоксичні властивості CCPs тестують на препараті ізольованих пресинаптичних нервових закінченнях кори головного мозку (синаптосомах), контролюючи позаклітинний рівень збудливого нейромедіатора L-[¹⁴C] глутамату.

3.4.1. Вплив нефункціоналізованих нанопористих частинок вуглецю із сухих яблук (CCPs) на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату в препаратах нервових закінчень

Вплив CCPs на позаклітинний рівень нейромедіатора L-[¹⁴C]глутамату оцінюють в препаратах нервових закінчень. CCPs не впливають на позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у концентрації 1,0 мг/мл (Рис. 9). Тобто CCPs не мають нейротоксичних ознак і є біосумісним у концентрації 1,0 мг/мл (N. V. Krisanova et al., 2024).

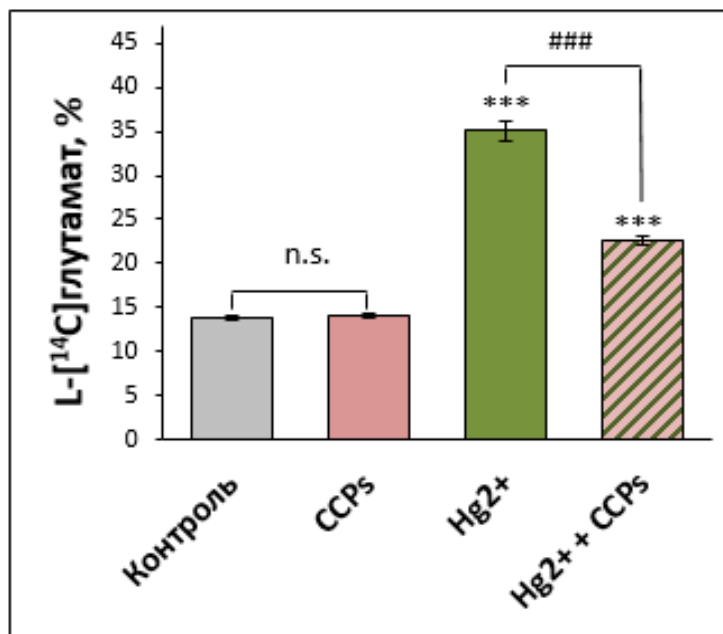


Рис. 10 Позаклітинний рівень L-[¹⁴C]глутамату у препаратах нервових терміналей у контролі, за присутності CCPs (1,0 мг/мл), Hg²⁺ (5 мкМ HgCl₂). та за їх комбінованого впливу. Суміш CCPs та Hg²⁺ інкубують 30 хв. перед додаванням до нервових закінчень. Дані представлені у вигляді середнього значення ± SEM; ***, $p < 0,001$, n.s., відсутність достовірної різниці порівняно з контролем; ###, $p < 0,001$ порівняно з дією Hg²⁺; $n = 9$.

Потім досліджують здатність частинок знижувати гостру нейротоксичність, індуковану Hg²⁺. CCPs, синтезовані методом піролізу, знижують токсичні ефекти Hg²⁺ на позаклітинний синаптосомальний рівень L-[¹⁴C] глутамату (Рис. 9).

Узагальнення

Методичні рекомендації охоплюють увесь цикл аналітичного процесу від отримання препарату ізольованих нервових терміналей, етичних норм роботи з експериментальними тваринами, теоретичних основ функціонування пресинапсу, важливості підтримання низького позаклітинного рівня збуджувального нейромедіатора глутамату та його вимірювання з використанням радіоактивно міченого глутамату, як ключової характеристики нейротрансмісії, методичні основи дослідження нейротоксичного впливу важких металів на прикладі ртуті та здатності нанорозмірних частинок (на прикладі карбонових точок) та мікророзмірних частинок (на прикладі частинок, отриманих з українських сільськогосподарських відходів, а саме сухих яблук) знижувати метал-індуковану нейротоксичність та адсорбувати важкі метали в біологічній системі.

Описані методичні аспекти містять теоретичний матеріал та значною мірою базуються на особистому досвіді укладачів, але не є вичерпними.

Розроблена і описана модель гострої метал-індукованої ексайтотоксичності є надійною системою для аналізу здатності нано- та мікророзмірних частинок адсорбувати важкі метали в біологічній системі.

Результати, одержані з використанням цієї модельної системи є основою для створення концепції та формування нових уявлень щодо молекулярних механізмів регулювання та модулювання процесів активного транспорту нейромедіаторів у пресинапсі, що лежать в основі синаптичної пластичності нейрональних процесів.

Успішне дослідження хелаторів важких металів створює нейрохімічне підґрунтя для розробки стратегії нейрокорегування ексайтотоксичності та нейропротекції шляхом модулювання процесів збудження, відкриває нові шляхи діагностики, профілактики, тераностики, подолання розвитку та успішного лікування нейрологічних розладів.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal blue or grey ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Перелік рекомендованої літератури

- Alqaraleh, M., Khleifat, K.M., Abu Hajleh, M.N., Farah, H.S., Ahmed, K.A.A., 2023. Fungal-Mediated Silver Nanoparticle and Biochar Synergy against Colorectal Cancer Cells and Pathogenic Bacteria. *Antibiotics* 12, 597.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12030597>
- ATSDR, 2024. ATSDR [WWW Document]. URL
<https://search.cdc.gov/search/?query=Pb Hg ta Cd&siteLimit=atsdr.cdc.gov&dpage=1> (accessed 11.28.24).
- Borisova, T., Borysov, A., 2016. Putative duality of presynaptic events. *Rev. Neurosci.* 27, 377–383. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0044>
- Carmona, A., Roudeau, S., Ortega, R., 2021. Molecular mechanisms of environmental metal neurotoxicity: A focus on the interactions of metals with synapse structure and function. *Toxics* 9, 198.
<https://doi.org/10.3390/toxics9090198>
- Chen, Yaoning, Liu, Y., Li, Y., Chen, Yanrong, Wu, Y., Li, H., Wang, S., Peng, Z., Xu, R., Zeng, Z., 2020. Novel Magnetic Pomelo Peel Biochar for Enhancing Pb(II) And Cu(II) Adsorption: Performance and Mechanism. *Water. Air. Soil Pollut.* 231, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04788-4>
- Cotman, C.W., 1974. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.* 31, 445–452.
- Dai, Y., Sun, Q., Wang, W., Lu, L., Liu, M., Li, J., Yang, S., Sun, Y., Zhang, K., Xu, J., Zheng, W., Hu, Z., Yang, Y., Gao, Y., Chen, Y., Zhang, X., Gao, F., Zhang, Y., 2018. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere* 211, 235–253.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179>
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
[https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8)
- Dong, F.X., Yan, L., Zhou, X.H., Huang, S.T., Liang, J.Y., Zhang, W.X., Guo, Z.W., Guo, P.R., Qian, W., Kong, L.J., Chu, W., Diao, Z.H., 2021. Simultaneous

- adsorption of Cr(VI) and phenol by biochar-based iron oxide composites in water: Performance, kinetics and mechanism. *J. Hazard. Mater.* 416, 125930. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125930>
- Engin, A.B., Engin, E.D., Golokhvast, K., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M., 2017. Glutamate-mediated effects of caffeine and interferon- γ on mercury-induced toxicity. *Int. J. Mol. Med.* 39, 1215–1223. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2937>
- Fonfría, E., Vilaró, M.T., Babot, Z., Rodríguez-Farré, E., Suñol, C., 2005. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 545–553. <https://doi.org/10.1002/jnr.20375>
- Han, J., Meng, J., Chen, S., Li, C., 2019. Integrative analysis of the gut microbiota and metabolome in rats treated with rice straw biochar by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *Sci. Rep.* 9, 17860. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54467-6>
- Khairul Anuar, N.K., Tan, H.L., Lim, Y.P., So'aib, M.S., Abu Bakar, N.F., 2021. A Review on Multifunctional Carbon-Dots Synthesized From Biomass Waste: Design/ Fabrication, Characterization and Applications. *Front. Energy Res.* 9, 626549. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.626549>
- Krisanova, N., Kasatkina, L., Sivko, R., Borysov, A., Nazarova, A., Slenzka, K., Borisova, T., 2013. Neurotoxic potential of lunar and martian dust: influence on em, proton gradient, active transport, and binding of glutamate in rat brain nerve terminals. *Astrobiology* 13, 679–92. <https://doi.org/10.1089/ast.2012.0950>
- Krisanova, N., Pastukhov, A., Dekaliuk, M., Dudarenko, M., Pozdnyakova, N., Driuk, M., Borisova, T., 2024. Mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals: modulatory effects of carbonaceous airborne particulate simulants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 31, 3512–3525. <https://doi.org/10.1007/S11356-023-31359-X/METRICS>
- Krisanova, N. V., Pariiska, O.O., Pozdnyakova, N. G. Dudarenko, M. V., Borysov, A.A., Sivko, R. V., Kurys, Y.I., Mazur, D.O., Terebilenko, A. V. Koshechko, V.G., Kolotilov, S. V., Borisova, T.A., 2024. Neurotoxic risk and adsorption

- properties of coarse non-functionalized carbon particles derived from apple waste. *Biotechnol. Acta* 17, 51–61. <https://doi.org/10.15407/biotech17.04.051>
- Larson, E., Howlett, B., Jagendorf, A., 1986. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.* 155, 243–248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90432-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90432-X)
- Liu, Z., Yang, Q., Cao, L., Li, S., Zeng, X., Zhou, W., Zhang, C., 2023. Synthesis and Application of Porous Carbon Nanomaterials from Pomelo Peels: A Review. *Molecules* 28, 4429. <https://doi.org/10.3390/molecules28114429>
- Lopes de Andrade, V., Marreilha dos Santos, A.P., Aschner, M., 2021. Neurotoxicity of metal mixtures, in: *Advances in Neurotoxicology*. Elsevier Inc., pp. 329–364. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2020.12.003>
- Omar, R.A., Talreja, N., Chuhan, D., Ashfaq, M., 2024. Waste-derived carbon nanostructures (WD-CNs): An innovative step toward waste to treasury. *Environ. Res.* 246, 118096. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.118096>
- Splettstoesser, T., 2024. Action potentials and synapses - Queensland Brain Institute - University of Queensland [WWW Document]. URL <https://qbi.uq.edu.au/brain-basics/brain/brain-physiology/action-potentials-and-synapses> (accessed 11.27.24).
- Sudhof, T.C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Tohamy, H.A.S., El-Sakhawy, M., Kamel, S., 2023. Eco-friendly Synthesis of Carbon Quantum Dots as an Effective Adsorbent. *J. Fluoresc.* 33, 423–435. <https://doi.org/10.1007/s10895-022-03085-z>
- Wang, Q., Shi, X., Tang, S.F., Wang, H., Chen, Y., Zhang, N., 2024. Preparation of a β -cyclodextrin grafted magnetic biochar for efficient extraction of four antiepileptic drugs in plasma samples. *J. Chromatogr. A* 1724, 464893. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464893>
- World Health Organisation, 2017. Mercury and health [WWW Document]. 2017. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (accessed 11.16.23).

- World Health Organisation, 2007. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. Jt. WHO I Conv. Task Force Heal. Asp. Air Pollut. 2–144.
- Yin, Z., Xu, Shuang, Liu, S., Xu, Shuying, Li, J., Zhang, Y., 2020. A novel magnetic biochar prepared by K₂FeO₄-promoted oxidative pyrolysis of pomelo peel for adsorption of hexavalent chromium. Bioresour. Technol. 300, 122680. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122680>
- Борисов А. А., 2017. Акумуляція та вивільнення глутамату нервовими терміналями головного мозку щурів за дії феритину та важких металів, Дис.. канд. біол. наук: 03.00.04. Київ, 2017. 105 с.
- Крисанова Н. В., 2011. Акумуляція та вивільнення глутамату нервовими терміналями головного мозку щурів за умов гіпергравітації., Дис.. канд. біол. наук: 03.00.04. Київ, 2011. 138 с.