НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Дрюк Микола Миколайович

УДК 577.175.8, 577.175.8, 612.3/.8:577:57.02:502/504

ДИСЕРТАЦІЯ

Нейроактивні забруднювачі навколишнього середовища: мембрано-асоційовані механізми дії та шляхи подолання нейротоксичності

091 – Біологія
09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ / М.М. Дрюк /

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу нейрохімії Борисова Тетяна Олександрівна

Київ 2026

АНОТАЦІЯ

Дрюк М.М. Нейроактивні забруднювачі навколишнього середовища: мембрано-асоційовані механізми дії та шляхи подолання нейротоксичності. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена встановленню молекулярних механізмів гострої нейротоксичної дії іонів ртуті (Hg^{2+}) у пресинаптичних нервових закінченнях головного мозку щурів, дослідженню особливостей комбінованої дії Hg^{2+} та вуглецевих частинок диму, а також оцінці перспективності різних наноматеріалів як потенційних адсорбентів/детоксикантів цього іону металу в біологічних системах.

Актуальність роботи зумовлена широким поширенням нейродегенеративних і неврологічних захворювань, розвиток яких пов'язують, зокрема, із забрудненням довкілля важкими металами та твердими частинками повітря. Особливу небезпеку становить ртуть, яка здатна накопичуватися в організмі та порушувати функціонування центральної нервової системи. Незважаючи на значний обсяг досліджень, молекулярні механізми нейротоксичної дії Hg^{2+}, особливо за умов комбінованого впливу з вуглецевими частинками диму, залишаються недостатньо вивченими. Перспективним напрямом є також пошук біосумісних наноматеріалів, здатних зв'язувати іони ртуті та зменшувати їх токсичний вплив на організм.

У ході виконання роботи встановлено, що Hg^{2+} порушує функціонування глутаматергічної нейропередачі в нервових терміналях головного мозку щурів. Показано, що починаючи з концентрації 10 мкМ Hg^{2+} знижує початкову швидкість транспорту та накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами, що супроводжується ексайтотоксичним підвищенням його

позаклітинного рівня. Встановлено, що це підвищення є наслідком пригнічення функціональної активності транспортерів глутамату, а не порушення цілісності плазматичної мембрани та посилення тонічного вивільнення нейромедіатора.

Вперше проведено порівняльне дослідження біосумісності та Hg^{2+}-адсорбувальних властивостей різних типів наноматеріалів у біологічній системі нервових терміналей. Встановлено, що лише вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти та сечовини, а також з зерен кави, є біосумісними та здатні послаблювати Hg^{2+}-індуковане ексайтотоксичне підвищення позасинаптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату. Натомість вуглецеві точки, синтезовані з β-аланіну, а також наноалмази не виявили здатності адсорбувати Hg^{2+} у досліджуваній біологічній системі. Розроблений методичний підхід може бути застосований для моніторингу здатності різних частинок/сполук мати ознаки адсорбування Hg^{2+} в біологічних системах.

Встановлено, що мезопористі кремнеземні наночастинки, функціоналізовані SH-, SO_3H- та NH_2-групами, не проявляють ознак гострої нейротоксичності та характеризуються високою біосумісністю, однак не знижують нейротоксичної дії Hg^{2+}, що свідчить про відсутність їх адсорбувальної активності щодо цього металу. Отримані результати свідчать про перспективність використання таких наночастинок як носіїв біологічно активних речовин і лікарських засобів, які здатні усунути токсичну дію ртуті.

Вперше показано, що тверді вуглецеві частинки диму з деревини підвищують нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом, а їх комбінована дія з Hg^{2+} викликає нейротоксичний ефект щодо накопичення та вивільнення L-[^{14}C]глутамату і [^{3}H]ГАМК. Встановлено, що як Hg^{2+}, так і вуглецеві частинки диму з деревини окремо викликають деполяризацію плазматичної мембрани нервових терміналей, тоді як їх комбінований вплив не перевищує ефекту кожного чинника окремо. Аналогічний характер взаємодії виявлено і при дослідженні ацидифікації синаптичних везикул.

Ключові слова: нейротоксичність, ртуть (Hg^{2+}), важкі метали, тверді вуглецеві частинки диму, вуглецеві точки, мезопористі наночастинки діоксиду кремнію, наноматеріали, глутамат, синаптосоми, пресинаптичні нервові закінчення, нервова система, агрегометрія, тваринні моделі, біосумісність.

ANNOTATION

Driuk M.M. Neuroactive environmental pollutants: membrane-associated mechanisms of action and ways to overcome neurotoxicity. Qualifying scientific work submitted as a manuscript.

Dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Specialty 091 "Biology." – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

The PhD thesis is devoted to elucidating the molecular mechanisms of the acute neurotoxic effects of mercury ions (Hg^{2+}) in presynaptic nerve terminals of the rat brain, investigating the features of the combined action of Hg^{2+} and carbonaceous smoke particles, as well as evaluating the potential of various nanomaterials as prospective adsorbents/detoxifying agents for this metal ion in biological systems.

The relevance of the study is determined by the widespread prevalence of neurodegenerative and neurological diseases, the development of which is associated, in particular, with environmental contamination by heavy metals and airborne particulate matter. Mercury is of particular concern because of its ability to accumulate in the body and disrupt the functioning of the central nervous system. Despite the considerable body of research, the molecular mechanisms underlying the neurotoxic effects of Hg^{2+}, particularly under conditions of combined exposure to carbonaceous smoke particles, remain insufficiently understood. Another promising research direction is the search for biocompatible nanomaterials capable of binding mercury ions and reducing their toxic effects on the organism.

During the course of the study, it was established that Hg^{2+} disrupts glutamatergic neurotransmission in the nerve terminals of the rat brain. It was shown that, starting from a concentration of 10 μM, Hg^{2+} decreases the initial rate of L-[^{14}C]glutamate transport and accumulation by synaptosomes, which is accompanied by an excitotoxic increase in its extracellular level. It was established that this increase results from the inhibition of the functional activity of glutamate

transporters rather than from impaired plasma membrane integrity or enhanced tonic neurotransmitter release.

For the first time, a comparative study of the biocompatibility and Hg^{2+}-adsorbing properties of different types of nanomaterials in the biological system of nerve terminals was performed. It was established that only carbon dots synthesized from citric acid and urea, as well as from coffee beans, are biocompatible and capable of attenuating the Hg^{2+}-induced excitotoxic increase in the extrasynaptosomal level of L-[^{14}C]glutamate. In contrast, carbon dots synthesized from β-alanine, as well as nanodiamonds, did not demonstrate the ability to adsorb Hg^{2+} in the biological system under study. The developed methodological approach can be applied to monitor the ability of various particles/compounds to exhibit Hg^{2+}-adsorbing properties in biological systems.

It was established that mesoporous silica nanoparticles functionalized with SH-, SO_3H-, and NH_2-groups do not exhibit signs of acute neurotoxicity and are characterized by high biocompatibility; however, they do not reduce the neurotoxic effects of Hg^{2+}, indicating the absence of their adsorptive activity toward this metal. The obtained results demonstrate the potential of using such nanoparticles as carriers of biologically active substances and pharmaceutical agents capable of eliminating the toxic effects of mercury.

For the first time, it was shown that solid carbonaceous particles derived from wood smoke increase the unstimulated release of L-[^{14}C]glutamate from synaptosomes, and that their combined action with Hg^{2+} exerts a neurotoxic effect on the accumulation and release of L-[^{14}C]glutamate and [^{3}H]GABA. It was established that both Hg^{2+} and carbonaceous particles derived from wood smoke separately induce depolarization of the plasma membrane of nerve terminals, whereas their combined exposure does not exceed the effect of either factor alone. A similar pattern of interaction was also observed in the study of synaptic vesicle acidification.

Keywords: Neurotoxicity, mercury (Hg^{2+}), heavy metals, carbonaceous particulate matter, carbon dots, mesoporous silicon dioxide nanoparticles, nanomaterials, glutamate, synaptosomes, presynaptic nerve terminals, nervous system, aggregometry, animal models, biocompatibility.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ

Матеріали дисертації опубліковано у 4 наукових статтях у фахових виданнях, в тому числі 2 статті – у міжнародних наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science: Q1 – 1 стаття, Q1/Q2 – 1 стаття, та 2 статті – у вітчизняних виданнях категорії «Б», та в 3 тезах доповідей на наукових конференціях.

1. Krisanova N., Pastukhov A., Dekaliuk M., Dudarenko M., Pozdnyakova N., Driuk M., Borisova T. Mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals: modulatory effects of carbonaceous airborne particulate simulants. Environ Sci Pollut Res Int. 2024. - 31(3), 3512–3525. https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-31359-x (IF 5.6; Q1/Q2). *Внесок здобувача: експериментальна роботи з наноалмазами, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.*

2. Krisanova N., Paliienko K., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Kalynovska L., Dudarenko M., Borysov A., Skryshevsky V., Lysenko V., Borisova T. “Green” carbon dots from coffee waste for adsorption of xenobiotic and trace heavy metals in both aquatic and physiological media. // Environ. Sci. Nano. - 2025. - V.12, P.4395–4407. https://doi.org/10.1039/D5EN00345H Q1. *Внесок здобувача: методологія та дослідження, супровід експериментальної роботи.*

3. Sotnik S. O., Pavliei I. M., Pariiska O.O., Kurys Y.I., Dudarenko M.V., Borysov A.A., Krisanova N. V., Pozdnyakova N. G., Kalynovska L. M., Driuk M. M., Pastukhov A. O., Tarasenko A. S., Borisova T. A., Koshechko V. G., Kolotilov S. V. Amino-grafted mesoporous silica nanoparticles: assessment of neuromodulatory, membranotropic and antioxidant properties in cortex nerve terminals // Biotechnologia Acta. - 2024. - T. 17, No. 6. - P. 5-14. https://doi.org/10.15407/biotech17.06.005. *Внесок здобувача: отримання*

препаратів синаптосом, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.

4. Sotnik S. O., Pavliei I. M., Pozdnyakova N. G., Pastukhov A. O., Pariiska O. O., Dudarenko M. V., Krisanova N. V., Sivko R. V., Driuk M. M., Kalynovska L. M., Panas I. D., Borisova T. A., Kolotilov S. V. Functionalized mesoporous silica nanoparticles: analysis of neurotoxicity and heavy metal detoxication capability. Biotechnologia Acta V. 18, No. 5, 2025, P. 5-13. https://doi.org/10.15407/biotech18.05.005. *Внесок здобувача: методологія та дослідження, супровід експериментальної роботи.*

ПЕРЕЛІК ТЕЗ ДОПОВІДЕЙ НА КОНФЕРЕНЦІЯХ

1. Driuk M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Pastukhov A., Borisova T. Prevention of mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals with carbon dots. // Biotechnologia Acta. - 2024. - T. 17, No. 2. - P. 38-40. DOI: https://doi.org/10.15407/biotech17.02.038. *Внесок здобувача: супровід експериментальної роботи, аналіз даних.*

2. Dudarenko M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Panas I., Borisova Modulatory effect of carbon dots on mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve T. terminals // 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11 - 12, 2024. - Bratislava, Slovakia, Abstract book, P. 78. ISBN 978-615-6006-05-9. *Внесок здобувача: супровід експериментальної роботи, аналіз даних*

3. Dudarenko M.V., Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Pastukhov A.O., Driuk M.M., Panas I.D., Borisova T.O. Spontaneous ROS Generation in the Presynaptic Brain Nerve Terminals during Combined Application of Cadmium and Smoke PM Preparations // 20th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 2 - 3, 2025 Prague, Czech Republic, Abstract book P. 13. ISBN 978-615-6006-06-6. *Внесок здобувача: оптимізація методу*

отримання водо - суспендованого препарату вуглецевих твердих частинок диму та постійний синтез цього препарату, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 15

ВСТУП 16

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 22

1.1. Нейротоксичність важких металів та їх роль у розвитку нейродегенеративних захворювань 22

1.1.1. Молекулярні механізми синаптичної передачі та функціональна організація нейромедіаторних систем 23

1.1.2. Забруднення довкілля як модифікований фактор ризику хвороби Альцгеймера 33

1.2. Ртуть: джерела експозиції, токсикокінетика та механізми нейротоксичної дії 38

1.2.1. Джерела розповсюдження ртуті 39

1.2.2. Фармакокінетика експозиції ртуттю 40

1.2.3. Токсичність ртуті 43

1.3. Видалення важких металів із води 44

1.3.1. Детоксикація в організмі важких металів розчинником 46

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 50

2.1 Реактиви та матеріали 50

2.1.1. Етичні норми 50

2.2. Методи 51

2.2.1. Аналіз препаратів диму за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії 51

2.2.2. Виділення синаптосом з головного мозку щурів 51

2.2.3. Визначення вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом 52
2.2.4. Визначення вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом 52
2.2.5. Визначення накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами 53
2.2.6. Визначення накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами 54
2.2.7. Визначення мембранного потенціалу 54
2.2.8. Визначення ацидифікації синаптичних везикул 55
2.2.9. Оптимізація методології синтезу препаратів суспендованих у воді твердих частинок диму від згоряння суміші деревини 55
2.2.10. Статистичний аналіз даних 56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. 57
Розділ 3.1. Аналіз впливу Hg^{2+} на транспортування збуджуючого нейротрансмітера L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях головного мозку щурів, зокрема початкову швидкість і акумуляцію L[^{14}C]глутамату, його позасинаптосомальний рівень та тонічне вивільнення. 57
3.1.1. Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими закінченнями в присутності Hg^{2+} 58
3.1.2. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg^{2+} 60
3.1.3. Агрегація синаптосом за дії ртуті 63
Розділ 3.2. Дослідження модуляторного впливу класичних молекулярних хелаторів, вуглецевих точок та наноалмазів на Hg^{2+}-індуковані ефекти у нервових терміналях 65

3.2.1 Зниження дії Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень класичними молекулярними відновниками та хелатуючими агентами 65

3.2.2. Вплив вуглецевих точок, синтезованих з лимонної кислоти та сечовини, на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю 67

3.2.3. Вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату у присутності вуглецевих точок, синтезованих з β-аланіну (aCDs) 70

3.2.4. Вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату у присутності синтезованих наноалмазів (NDs) 72

3.2.5 Вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату/[^{3}H]ГАМК в нервових закінченнях у присутності вуглецевих точок, синтезованих з зерен кави 75

Розділ 3.3. Аналіз комбінованого впливу PM диму з суміші деревини і ртуті на транспортер опосередковане накопичення/вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових терміналях та на мембранний потенціал нервових терміналей та закислення синаптичних везикул 78

3.3.1. Комбінований вплив PM диму від згоряння суміші деревини і ртуті на транспортер опосередковане накопичення/вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових терміналях. 78

3.3.2. Комбінований вплив зразків PM диму від згоряння суміші деревини WPs і ртуті на мембранний потенціал нервових терміналей та закислення синаптичних везикул 82

Розділ 3.4. Функціоналізовані мезопористі наночастинки діоксиду кремнію: аналіз нейротоксичності та здатності знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} 84

3.4.1. Аналіз ризику гострої нейротоксичності MSN-SH та MSN-SO_3H у нервових закінченнях головного мозку щурів 85

3.4.2. Визначення здатності MSN-SH та MSN-SO_3H знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} в нервових закінченнях головного мозку щурів 88

3.4.3. Визначення біосумісності MSN з закріпленими аміногрупами MSN-NH_2 та їх здатності знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} в нервових закінченнях головного мозку щурів 90

РОЗДІЛ 4. Заключна частина. 94

ВИСНОВКИ 97

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 99

ДОДАТОК 1 115

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

WHO – Всесвітня організація охорони здоров’я (World Health Organization);

PM – Тверді частинки (particulate matter);

GPCRs – ліганд-керовані іонні канали та рецептори, спряжені з G-білками;

ATP – аденозинтрифосфат;

GABA – γ-аміномасляна кислота;

AD – хвороба Альцгеймера;

APOE ε4 – алеля ε4 гена аполіпопротеїну E;

HgS – нерозчинні сульфіди металів;

SDTC — Диметилдитіокарбамат натрію;

STC — трітіокарбонат натрію;

Hg – ртуть;

ЦНС – центральна нервова система;

NMDA – антагоніст N-метил-D-аспартатних рецепторів;

MeHg – метилртуть;

one-way ANOVA – однофакторний дисперсійний аналіз;

DL-TBOA – інгібітор транспортерів глутамату DL-трео-β-бензилоксіаспартату;

DTT – дитіотреїтол;

EGTA – етиленглікольбіс(2-аміноетил)тетраоцтова кислота;

CD – вуглецеві точки;

NDs – синтезовані наноалмази;

WPs - частинки диму від згоряння деревини;

two-way ANOVA – двофакторний дисперсійний аналіз.

ВСТУП

Актуальність. Нейрологічні розлади є третьою за поширеністю причиною інвалідності та передчасної смерті в ЄС, і їх розповсюдження, ймовірно, буде зростати, що підкреслюється у журналі Lancet Public Health [1]. Етіологія нейрологічних розладів досі залишається нез'ясованою, а їх стабільне зростання пов'язують, зокрема, із забрудненням довкілля важкими металами та твердими частинками повітря (PM), вплив яких викликає розвиток нейропатологій, наприклад інсульту, хвороби Альцгеймера та Паркінсона та розлади у розвитку нервової системи.

Особливу небезпеку становить ртуть, яка здатна накопичуватися в організмі та порушувати функціонування центральної нервової системи. Використання різних типів озброєння викликають підвищення вмісту важких металів в навколишньому середовищі, зокрема Hg^{2+}, Pb^{2+} та Cu^{2+}. Наприклад ртуть, а саме гримуча ртуть (фульмінат ртуті) історично використовувалася у капсульних запальних сумішах ініціюючих речовин як детонатор порохового заряду. Свинець та мідь є основною частиною для боєприпасів до стрілецької зброї.

Вплив забруднення повітря PM призводить до когнітивної дисфункції [4-6]. Тверді частинки-забруднювачі повітря перетинають кордони, океани та континенти і спричиняють глобальну небезпеку для здоров'я людей. Молекулярні механізми розвитку патологій мозку, спричинених забрудненням повітря PM, не вивчені [5, 7]. PM, забруднювачі повітря, мають різну природу та походження, а тому і різноманітні нейроактивні властивості.

Під час воєнних дій в Україні виникає велика кількість пожеж та вибухів під час яких утворюється велика кількість твердих частинок. Згідно даних системи Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів «Екозагроза», найбільшої шкоди внаслідок воєнних дій завдається саме атмосферному повітрю через великий викид різних забруднюючих речовин та твердих

частинок. Майже три мільйони гектарів мішаного лісу в Україні були охоплені війною від початку повномасштабного вторгнення. Численні вибухи призводять до виникнення лісових пожеж, а також до руйнування різних конструкції та будівель.

Внаслідок обстрілів нафтобаз та промислових підприємств в атмосферу потрапляють десятки тисяч тон шкідливих речовин та важких металів. Згоряння нафти та продуктів нафтопереробки, рідкого вуглеводневого палива спричиняє також викиди ртуті в атмосферу. Оскільки ртуть присутня як значний компонент забруднення повітря, води та ґрунту, очікується її взаємодія з твердими вуглецевими частинками диму. Дійсно, у навколишньому середовищі ртуть після її зв'язування з вуглецем переноситься з короткоживучих пулів вуглецю в довгоживучі. Беручи до уваги наведені вище факти, очікується, що нейротоксична дія ртуті та твердих вуглецевих частинок у повітрі може посилюватись у комплексі ртуть-частинки.

Дослідження мультикомпонентного забруднення є дуже перспективними для оцінки якості навколишнього середовища та ризику для здоров'я людини та біологічних організмів в цілому. У цьому контексті оцінка нейротоксичності комбінованого впливу ртуті та вуглецевих частинок у повітрі є значущою з точки зору сучасного мультикомпонентного підходу оцінки ризиків, однак літературних даних щодо цього питання немає.

Вуглецеві точки (CDs) мають специфічні та унікальні властивості, що робить їх цікавими об'єктами дослідження та перспективними для широкого спектра застосувань, зокрема в екологічному моніторингу, в технологіях відновлення водних ресурсів, харчових та аграрних технологіях, а також використанню для видалення важких металів, оскільки вони містять численні функціональні групи, що забезпечують ефективне та екологічно безпечне видалення важких металів та використання їх у ролі хелаторів.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у встановленні молекулярних механізмів гострої нейротоксичної дії Hg^{2+} у нервових терміналях головного мозку щурів та оцінці перспективності різних наноматеріалів як потенційних адсорбентів/детоксикантів цього металу в біологічних системах.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Дослідити вплив Hg^{2+} на транспортування збуджуючого нейротрансмітера L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях головного мозку щурів, зокрема початкову швидкість і акумуляцію L-[^{14}C]глутамату, його позасинаптосомальний рівень та тонічне вивільнення L-[^{14}C]глутамату.

2. Розробити методичний підхід для моніторингу здатності різних частинок/сполук до адсорбування/детоксикації Hg^{2+} в біологічних системах. Дослідити модуляторний вплив вуглецевих точок та наноалмазів на Hg^{2+}-індуковані ефекти у нервових терміналях.

3. Провести аналіз комбінованого впливу Hg^{2+} та твердих вуглецевих частинок диму на ключові параметри нейропередачі у нервових терміналях, а саме накопичення та нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК, мембранний потенціал нервових терміналей та закислення синаптичних везикул.

4. Дослідити потенційний нейротоксичний ризик мезопористих кремнеземних наночастинок, функціоналізованих SH-, SO_3H- та NH_2-групами, та їх здатність знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+}.

Об’єктом дослідження є система активного транспорту глутамату в пресинаптичних нервових закінченнях (синаптосомах) головного мозку щурів.

Предметом дослідження є порушення функціонування транспортерів глутамату за дії Hg^{2+}, механізм розвитку Hg^{2+} - індукованої нейротоксичності та шляхи її подолання.

Методи дослідження.

У роботі використовувались наступні методи: виділення синаптосом за методом Котмана, визначення вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК, визначення накопичення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК, визначення мембранного потенціалу та ацидифікації синаптичних везикул флуориметричними методами. Була оптимізована методологія синтезу препаратів суспендованих у воді вуглецевих частинок диму, а також використовували агрегометрію та статистичний аналіз даних.

Наукова новизна одержаних результатів.

Наукове значення роботи полягає у встановленні нових закономірностей гострої нейротоксичної дії іонів Hg^{2+} на пресинаптичні нервові закінчення головного мозку та з'ясуванні механізмів порушення глутаматергічної нейропередачі. Вперше показано, що ексайтотоксичне підвищення позаклітинного рівня глутамату за дії Hg^{2+} обумовлене пригніченням функціональної активності транспортерів глутамату, а не пошкодженням плазматичної мембрани чи посиленням тонічного вивільнення нейромедіатора. Вперше проведено порівняльну оцінку біосумісності та Hg^{2+}-адсорбувальних властивостей вуглецевих точок різного походження, наноалмазів і функціоналізованих мезопористих кремнеземних наночастинок у моделі нервових терміналей. Встановлено, що вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти та сечовини та з зерен кави, здатні послаблювати Hg^{2+}-індуковану ексайтотоксичність. Також отримано нові дані щодо адитивного нейротоксичного ефекту комбінованої дії твердих частинок диму та Hg^{2+}, що розширює сучасні уявлення про механізми мультизабруднювальної нейротоксичності.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення роботи полягає у розробленні експериментального підходу з використанням

пресинаптичних нервових терміналей головного мозку як високочутливої тест-системи для оцінки біосумісності наноматеріалів, їх нейротоксичності та здатності до адсорбції/детоксикації іонів важких металів у біологічних системах. Отримані результати обґрунтовують перспективність застосування вуглецевих точок, синтезованих з лимонної кислоти та сечовини, а також зерен кави, як безпечних наноматеріалів для створення сорбентів та детоксикаційних препаратів для видалення ртуті з організму. Встановлена висока біосумісність функціоналізованих мезопористих кремнеземних наночастинок свідчить про доцільність їх подальшого використання як наноплатформ для адресної доставки біологічно активних речовин і лікарських засобів. Результати дослідження також можуть бути використані під час розроблення нових підходів до оцінки ризиків комбінованого впливу важких металів та вуглецевих твердих частинок диму на нервову систему, а також у дослідженнях з екологічної нейротоксикології, нанобіотехнології та нейрофармакології.

Особистий внесок здобувача.

Тему, мету та завдання роботи було сформульовано дисертантом спільно з науковим керівником д.б.н., професором, Т.О. Борисовою. Виділення синаптосом з головного мозку щурів проведено спільно зі с.н.с. Н.Г. Поздняковою, н.с. А.О. Пастуховим та н.с. Сівком Р.В. Приготування стокових і буферних розчинів та інших реактивів здійснено спільно зі с.н.с. Н.Г. Поздняковою та н.с А.О. Пастуховим. Оптимізацію методу отримання водо - суспендованого препарату вуглецевих твердих частинок диму та власно постійний синтез цього препарату проводився дисертантом особисто. Радіоізотопні дослідження виконані спільно з н.с. А.О. Пастуховим та м.н.с. М.В. Дударенко. Агрегометрічні дослідження виконані дисертантом особисто. Спектрофлуориметричні дослідження здійснено спільно зі с.н.с. Н.В.

Крисановою. Аналіз результатів досліджень та їх узагальнення здійснено спільно з науковим керівником зав. відділу, проф. Т.О. Борисовою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Тема № 3, Державний реєстраційний номер: 0124U000232, «Молекулярні механізми порушення транспортування збуджуючих та гальмівних нейромедіаторів у пресинапсі за умов нейропатологій та шляхи його корегування», (з 2024); тема № 3, Державний реєстраційний номер: 0119U002509, «Вивчення механізмів регуляції та рецептор-опосередкованої модуляції екзоцитозу та активного транспорту нейромедіаторів у пресинапсі в нормі та за умов, що призводять до розвитку нейропатологій», (2019-2023).

Апробація результатів дисертації.

Дисертант представив результати виконання дисертаційної роботи на вітчизняній конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, 2024.

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 4 наукових статтях у фахових виданнях, в тому числі 2 статті – у міжнародних наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science: Q1 – 1 стаття, Q1/Q2 – 1 статья, та 2 статті– у вітчизняних виданнях категорії «Б», та в 3 тезах доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота має загальноприйняту структуру, яка включає анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ та висновки, список використаних джерел, що містить 127 посилань, додаток. Дисертаційна робота викладена на 117 сторінках, містить 15 рисунків та 7 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Нейротоксичність важких металів та їх роль у розвитку нейродегенеративних захворювань

Зростання індустріалізації та розвитку виробництва зумовлює те, що забруднення навколишнього середовища важкими металами набуває глобального світового масштабу. Всесвітня організація охорони здоров'я (WHO) відносить свинець, ртуть, миш'як, кадмій, та інші токсичні метали до хімічних речовин, що становлять значну загрозу для здоров'я населення [1].

Невирішену глобальну проблему сучасного суспільства становить постійне зростання числа пацієнтів з нейрологічними та нейродегенеративними захворюваннями. Успішне лікування і попередження виникнення цих захворювань стримуються недостатністю фундаментальних знань, зокрема щодо впливу шкідливих факторів навколишнього середовища на ключові процеси синаптичної передачі центральній нервовій системі. Було встановлено зв’язок між підвищеним екологічним впливом і інтоксикацією організмів важкими металами та забруднення повітря твердими частинками (PM), з одного боку, та етіологією і патогенезом нейрологічних розладів і нейродегенеративних захворювань, включаючи хворобу Альцгеймера та хворобу Паркінсона з іншого боку [2, 3].

Моніторингові дослідження свідчать, що під час воєнних дій концентрація PM у атмосферному повітрі суттєво підвищується. Негативні ефекти можуть бути спричинені безпосередньо PM або різними токсичними сполуками, які адсорбуються на поверхні твердих частинок, що також збільшується під час воєнних дій. Забруднення ґрунтів і атмосферного повітря внаслідок воєнних дій знижує продуктивність агроекосистем, погіршує стан здоров’я населення та потребує рекультивації земель, впровадження сталих методів землекористування й ефективного контролю джерел викидів під час

післявоєнного відновлення [4]. Основними джерелами забруднення повітря карбон-вмісними частинками, саме під час воєнного стану, є дим від пожарів, вибухів, спалювання деревини, вугілля, пластику, сміття, вихлопи транспортних засобів [4, 5]. Важкі метали викидаються переважно в результаті різної промислової діяльності людини, і також під час воєнних дій та сприяють їх осадженню та накопиченню в ґрунтах. Вони стійкі в навколишньому середовищі та піддаються біоакумуляції в харчових ланцюгах та відповідно перенесенню на різні харчові рівні. Ртуть є токсичною в елементарній та неорганічній формах, але основне занепокоєння викликають органічні сполуки, особливо метилртуть, яка накопичується в харчовому ланцюзі - основному шляху впливу на організм людини [6, 7].

1.1.1. Молекулярні механізми синаптичної передачі та функціональна організація нейромедіаторних систем

Нервова система забезпечує регуляцію діяльності усіх систем організму та реакцію на зміну умов внутрішнього та зовнішнього середовища через обробку сенсорної інформації та контроль поведінки шляхом виконання величезної кількості обчислень. Ці обчислення відбуваються як усередині клітин, так і між клітинами, однак саме міжклітинна обробка інформації, що здійснюється за участю складних нейронних мереж, забезпечує нервовій системі її виняткові функціональні можливості. Основними клітинами, залученими до обробки інформації, є нейрони, яких налічуються сотні окремих клітинних типів, що відрізняються за морфологією, локалізацією, зв'язністю та хімічними характеристиками [8, 9]. Окрім нейронів, іншим основним типом клітин нервової системи є гліальні клітини (глія), які виконують критично важливі підтримувальні функції, проте дедалі частіше

розглядаються як такі, що беруть участь у деяких аспектах обробки інформації [10].

Різноманітні хімічні речовини, що переносять інформацію між нейронами, називаються нейромедіаторами. Отто Леві відкрив перший нейромедіатор у 1926 році, коли продемонстрував, що ацетилхолін переносить хімічний сигнал від блукаючого нерва до серця, уповільнюючи серцевий ритм. Відтоді понад сто речовин і значно більша кількість рецепторів були залучені до процесів синаптичної передачі. У нервових системах вищих тварин лише невелика частка нейронів безпосередньо бере участь у трансдукції сенсорної інформації або контролі клітин-ефекторів, таких як ендокринні клітини, клітини гладеньких м'язів або поперечносмугастих м'язів. Переважна більшість нейронів формує складні інтернейронні мережі, які забезпечують інтеграцію, обробку та передачу інформації в центральній нервовій системі [11].

Окрім виконання обчислень, орієнтованих на поточний момент, нервова система є пластичною; вона змінює саму себе (формує пам'ять) у процесі обробки інформації, що дає їй змогу в майбутньому реагувати більш адаптивно [12]. Тонкість і складність функціональних відповідей головного мозку, поряд із його здатністю змінюватися у відповідь на нову інформацію, забезпечуються багатим набором механізмів міжклітинної комунікації, які на анатомічному рівні включають складні, але пластичні локальні зв'язки, масштабніші нейронні кола та розташовані над ними глобальні регуляторні системи; а на хімічному рівні – великою кількістю нейромедіаторів із надзвичайно різноманітними механізмами декодування їхнього інформаційного вмісту [13].

Оскільки нейромедіатори відіграють настільки центральну роль у функціонуванні головного мозку, рецептори нейромедіаторів та інші білки, залучені до синтезу й інактивації нейромедіаторів, є критично важливими мішенями для розроблення терапевтичних лікарських засобів, призначених

для лікування неврологічних розладів, болю та багатьох інших захворювань [14]. Крім того, природні речовини, такі як кокаїн, опіати, нікотин, етиловий спирт та LSD, які здатні імітувати дію нейромедіаторів або перешкоджати їй, чинять потужний вплив на поведінку людини [15].

Нейрони спеціалізовані для приймання, обробки та передавання інформації (**Рис. 1.1**). Як перше наближення, інформація представлена в межах нейронів в електричній формі, а між нейронами – у хімічній формі за допомогою нейромедіаторів. Після вивільнення нейромедіатори дифундують через синапс і зв'язуються з постсинаптичними рецепторами. Слід зазначити, що, окрім хімічних синапсів, які становлять переважну більшість, існують також електричні синапси, що забезпечують потік іонів між клітинами через щілинні контакти [16, 17]. Електричні синапси, які надалі тут не розглядатимуться, забезпечують проходження простих електричних сигналів між нейронами, тоді як хімічні синапси, як буде показано далі, забезпечують передачу між клітинами збуджувальної, гальмівної та складної біохімічної інформації. Насправді було виявлено широкий спектр молекулярних структур, здатних функціонувати як рецептори нейромедіаторів, проте найчисленнішими серед них є ліганд-керовані іонні канали та рецептори, спряжені з G-білками (GPCRs; **Рис. 1.2**).

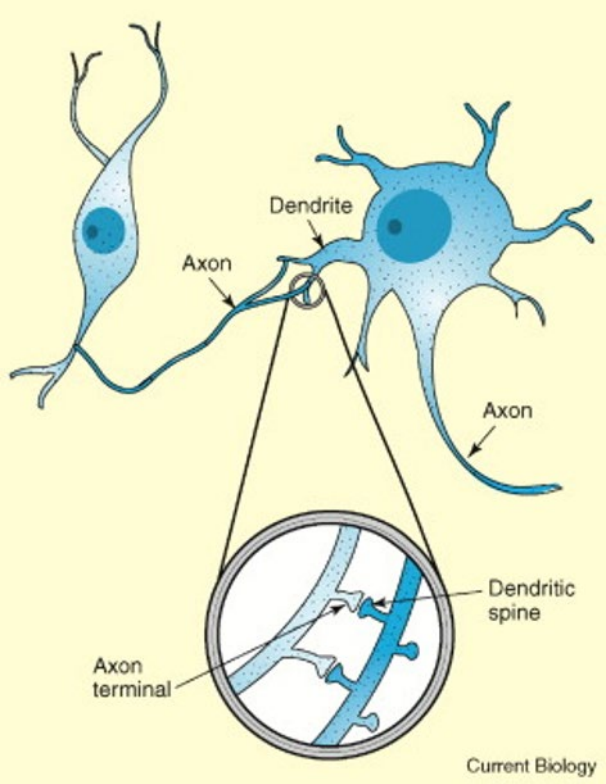


Рис. 1.1. Хімічна нейротрансмісія через синапси [17].

А **Б**

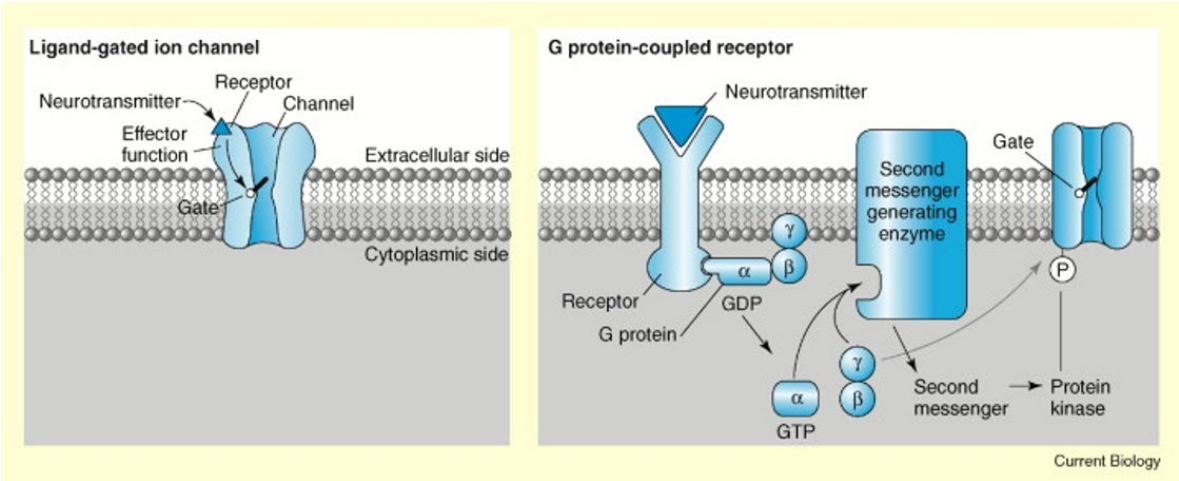


Рис. 1.2. Рецептори нейромедіаторів: А – іонотропні рецептори; Б – метаботропні рецептори [17].

Ці приклади не можуть бути повністю поширені на весь клас. Наприклад, пурин аденозинтрифосфат (АТР), який, незважаючи на свою роль

як молекули-переносника енергії, також здатний переносити інформацію [18-19], спільно локалізується у везикулах з іншими нейромедіаторами, такими як ацетилхолін або дофамін, і вивільняється внаслідок деполяризації; тоді як пурин аденозин вивільняється шляхом полегшеної дифузії. АТР взаємодіє як з іонотропними рецепторами (P2X-рецепторами), так і з рецепторами, спряженими з G-білками (P2Y-рецепторами), тоді як аденозин взаємодіє лише з рецепторами, спряженими з G-білками.

Як зазначалося в тексті, гліальні клітини в окремих випадках можуть безпосередньо брати участь у дії нейромедіаторів: наприклад, шляхом інактивації нейромедіатора, такого як глутамат, або шляхом вивільнення, наприклад, АТР чи D-серину.

Основними структурними елементами хімічного синапсу є пресинаптичне нервове закінчення, постсинаптична структура, що містить рецептори нейромедіаторів і відповідний апарат внутрішньоклітинної сигналізації, а також синаптична щілина між ними (**Рис. 1.3**). У більшості хімічних синапсів нейромедіатор зберігається в синаптичних везикулах, по кілька тисяч молекул у кожній везикулі. Газоподібні нейромедіатори, такі як NO і CO, не можуть зберігатися. Синаптичні везикули згруповані у спеціалізованих ділянках мембрани пресинаптичного закінчення, які називаються активними зонами; ці ділянки також містять високу щільність потенціалзалежних Ca^{2+}-каналів [17-20].

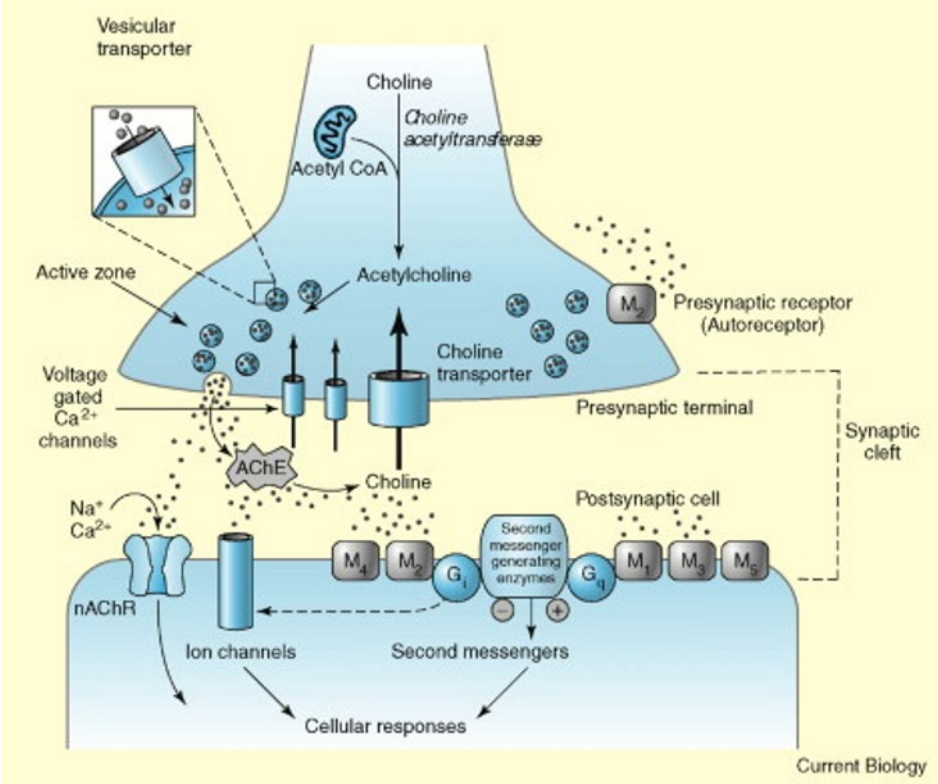


Рис. 1.3. Схема холінергічного синапсу [17].

У класичному випадку хімічної передачі нейромедіатор вивільняється пресинаптичним нейроном і зв'язується з рецепторами на постсинаптичному нейроні; зазвичай ці рецептори локалізовані на дендритах – ниткоподібних відростках тіла нейрона, які є основними структурами клітини, що приймають сигнали (**Рис. 1.1**). Хімічна інформація перетворюється рецепторами та пов'язаними з ними білками на електричну інформацію шляхом активації іонних каналів. У найпростішому випадку, як, наприклад, для нікотинових ацетилхолінових рецепторів або рецепторів γ-аміномасляної кислоти (GABAA), канал є власним структурним компонентом самого рецептора нейромедіатора (**Рис. 1.2**) [17-20].

У стані спокою мембрана нейрона є поляризованою, маючи негативний заряд. Регулюючи іонні канали, зв'язування нейромедіатора може активувати потоки іонів через мембрану. Залежно від того, які типи каналів активуються, у клітину можуть надходити або «гіперполяризувальні» негативні заряди, або

«деполяризувальні» позитивні заряди. Баланс негативних і позитивних зарядів інтегрується в дендритах і тілі нейрона, і якщо досягається пороговий рівень деполяризації, спеціалізовані потенціалзалежні Na^+-канали послідовно відкриваються, генеруючи хвилю деполяризації вздовж аксона – потенціал дії.

Коли потенціал дії досягає дистального кінця аксона – пресинаптичних закінчень, – надходження позитивного заряду активує потенціалчутливі Ca^{2+}-канали. Вхід Ca^{2+} потім ініціює процеси, унаслідок яких везикули зливаються з мембраною пресинаптичної клітини, вивільняючи нейромедіатор у синаптичну щілину. Коли нейромедіатори, такі як ацетилхолін або глутамат, активують катіонні (наприклад, Na^+ або Ca^{2+}) канали і, таким чином, спричиняють деполяризацію, їх можна охарактеризувати як збуджувальні; коли ж нейромедіатори, такі як GABA, активують аніонні (наприклад, Cl^-) канали, їх можна охарактеризувати як гальмівні [21-23].

Як зазначалося вище, нейромедіатори часто мають більше одного типу рецепторів. Для багатьох нейромедіаторів ці рецептори можуть суттєво відрізнятися як за структурою, так і за функцією. Так, окрім рецепторів, що є ліганд-керованими іонними каналами, ацетилхолін, глутамат і GABA також мають рецептори, спряжені з G-білками. Більшість рецепторів моноамінових нейромедіаторів і всі відомі рецептори нейропептидів є рецепторами, спряженими з G-білками, які іноді позначають громіздким терміном метаботропні рецептори (на відміну від іонотропних рецепторів). Рецептори, спряжені з G-білками, активують біохімічні каскади за участю G-білків, вторинних месенджерів і протеїнкіназ (**Рис. 1.2 і 1.3**). Активація рецептора, спряженого з G-білком, може призводити до змін мембранного потенціалу, проте початок цього процесу є повільнішим, ніж у випадку ліганд-керованого іонного каналу, оскільки в цьому випадку канал є окремою молекулою, яка повинна бути активована G-білком, вторинним месенджером або протеїнкіназою; в усіх випадках це є багатоступеневим процесом [17-23].

У деяких випадках активація рецептора, спряженого з G-білком, не має істотного впливу на мембранний потенціал, однак, активуючи протеїнкінази, які, наприклад, фосфорилюють іонні канали, вона може змінювати подальшу чутливість нейрона до збуджувальної або гальмівної нейротрансмісії. Активуючи системи вторинних месенджерів, протеїнкінази та експресію генів, рецептори, спряжені з G-білками, а також ті ліганд-керовані іонні канали, які забезпечують вхід Ca^{2+} (що сам по собі є вторинним месенджером), можуть також ініціювати функціональні [24, 25] і структурні зміни в нейронах [26], які становлять субстрат довготривалої пам'яті.

Не всі вивільнені молекули нейромедіатора знаходять рецептор, з яким можуть зв'язатися. Для підтримання точності синаптичної передачі дія надлишкового нейромедіатора в синапсі повинна швидко припинятися, щоб запобігти дифузії високих концентрацій нейромедіатора до невідповідних синапсів. Найпоширеніший механізм інактивації нейромедіаторів пов'язаний зі специфічними транспортерами нейромедіаторів, які можуть локалізуватися на пресинаптичному закінченні або, в окремих випадках, на сусідніх гліальних клітинах.

Рідше нейромедіатори інактивуються шляхом ферментативної деградації, як це відбувається у випадку ацетилхоліну, який розщеплюється високоактивним ферментом ацетилхолінестеразою, локалізованою в холінергічних синапсах. Показано, що декілька пептидних нейромедіаторів також піддаються деградації ферментами, однак, на відміну від низькомолекулярних нейромедіаторів, пептиди можуть дифундувати на значні відстані в нервовій системі, перш ніж досягнуть своїх мішеней або зазнають деградації [27]. Очевидно, що нейромедіатори з великим радіусом дифузії не беруть участі в такому точному передаванні інформації «від точки до точки», яке, наприклад, характерне для основних функцій зорової системи.

Історично проблема визначення того, які саме молекули дійсно функціонують як нейромедіатори, не була тривіальною. Цю проблему

ілюструє спостереження, що як глутамат, так і АТР можуть виконувати функції нейромедіаторів [28-30]. Переважна більшість обох цих молекул міститься в інших клітинних пулах, де вони функціонують, наприклад, як будівельні компоненти білків і нуклеїнових кислот відповідно або беруть участь у проміжному метаболізмі. Саме тому тривалий час існувала потреба у встановленні експериментальних критеріїв для визначення того, що певна речовина є нейромедіатором.

Не існує повної згоди щодо експериментальних критеріїв, проте один із репрезентативних їхніх представлених наборів [21] передбачає такі положення:

1. пресинаптичний нейрон містить відповідні синтетичні ферменти для утворення цієї речовини або, у випадку нейропептидів, експресує відповідний ген або гени;
2. речовина вивільняється у відповідь на стимуляцію пресинаптичного нейрона;
3. при експериментальному нанесенні цієї речовини на постсинаптичну клітину вона відтворює нормальну синаптичну передачу; існує локальний механізм припинення дії передбачуваного нейромедіатора;
4. постсинаптичні клітини містять рецептори до передбачуваного нейромедіатора;
5. антагоністи, які блокують ефекти цієї речовини при експериментальному застосуванні, також блокують ефекти нормальної нейротрансмісії у відповідних синапсах.

Насправді багато речовин, які загалом вважаються нейромедіаторами, не повністю відповідають усім цим критеріям. Наприклад, для багатьох пептидів відсутні селективні антагоністи, а в деяких випадках механізми їхньої інактивації ще належить встановити. Складність характеристики передачі сигналу в конкретному наборі синапсів також ускладнюється усвідомленням,

яке сформувалося ще у 1970-х роках, що нейрони часто вивільняють більше ніж один нейромедіатор із тих самих пресинаптичних закінчень, найчастіше – низькомолекулярну речовину разом з одним або кількома пептидами [31-33]. Визнання того, що такі гази, як NO і CO, можуть функціонувати як нейромедіатори, означає, що не всі нейромедіатори зберігаються у везикулах – ці гази дифундують крізь мембрани одразу після їхнього синтезу. Більше того, не всі передбачувані нейромедіатори синтезуються в нейронах: D-серин синтезується в протоплазматичних астроцитах, що оточують синапси [34, 35].

Також здійснювалися спроби знайти концептуальні принципи групування нейромедіаторів. Найменш проблематичними, імовірно, є класифікації, що ґрунтуються на хімічній природі цих речовин. Хімічні класифікації далекі від досконалості з функціональної точки зору, однак запропоновані функціональні класифікації наштовхнулися на ту обставину, що нейромедіатори мають множинні рецептори, і саме рецептор, а не нейромедіатор, фактично визначає функцію [36].

Незважаючи на значне структурне й функціональне різноманіття нейромедіаторів, узгоджена робота нейромедіаторних систем є необхідною умовою нормального функціонування центральної нервової системи. Порушення рецепторної взаємодії або інактивації нейромедіаторів призводить до змін синаптичної передачі, нейрональної пластичності та когнітивних функцій і є одним із ключових патогенетичних механізмів розвитку багатьох неврологічних і психіатричних захворювань. Особливе місце серед них посідає хвороба Альцгеймера (AD) [37], для якої поряд із накопиченням β-амілоїду [38] та гіперфосфорилюванням тау-білка характерні виражені порушення функціонування холінергічної, глутаматергічної та інших нейромедіаторних систем [39].

1.1.2. Забруднення довкілля як фактор ризику хвороби Альцгеймера

Хвороба Альцгеймера залишається однією з найважливіших медико-соціальних проблем сучасності. Незважаючи на значний прогрес у вивченні її молекулярних механізмів, ефективних методів, здатних повністю вилікувати захворювання або зупинити його прогресування, наразі не існує. Це зумовлює необхідність поглибленого дослідження патогенетичних механізмів, ранніх біомаркерів та факторів ризику розвитку захворювання [37].

Деменція являє собою клінічний синдром, що характеризується прогресуючим порушенням одного або кількох когнітивних доменів, зокрема пам'яті, мовлення, уваги, виконавчих функцій, сприйняття та соціального пізнання. AD є найпоширенішою причиною деменції, на яку припадає приблизно 60-70 % усіх випадків [40]. За даними WHO [41], у світі понад 57 млн людей живуть із деменцією, а внаслідок старіння населення її поширеність продовжує стрімко зростати. Однією з особливостей AD є те, що патологічні процеси розпочинаються за багато років, а іноді й десятиліть до появи перших клінічних симптомів, що значно ускладнює своєчасну діагностику та лікування.

Нині встановлено, що розвиток AD визначається складною взаємодією генетичних і негенетичних чинників [42]. Окрім спадкової схильності, дедалі більше уваги приділяється модифікованим факторам ризику, серед яких особливе несприятливі чинники навколишнього середовища, зокрема: забруднення атмосферного повітря та вплив токсичних металів, що можуть сприяти розвитку нейрозапалення, оксидативного стресу та синаптичної дисфункції [43]. Виявлення факторів ризику навколишнього середовища може суттєво вплинути на профілактику та лікування AD і пов’язаних із нею деменцій. Багато хімічних речовин навколишнього середовища давно відомі

як нейротоксичні [44-46], особливо у лабораторних моделях та у людей під час нейророзвитку.

У людських популяціях оцінка ймовірних факторів навколишнього середовища протягом періоду ризику до прояву захворювання є складною через потенційно тривалий латентний період хвороби (**рис. 1.4**). Дослідження впливу факторів довкілля на AD та пов’язані з нею деменції часто аналізують стан на момент появи клінічних симптомів, хоча релевантний вплив міг відбутися за роки або десятиліття до цього або навіть у ранньому віці.

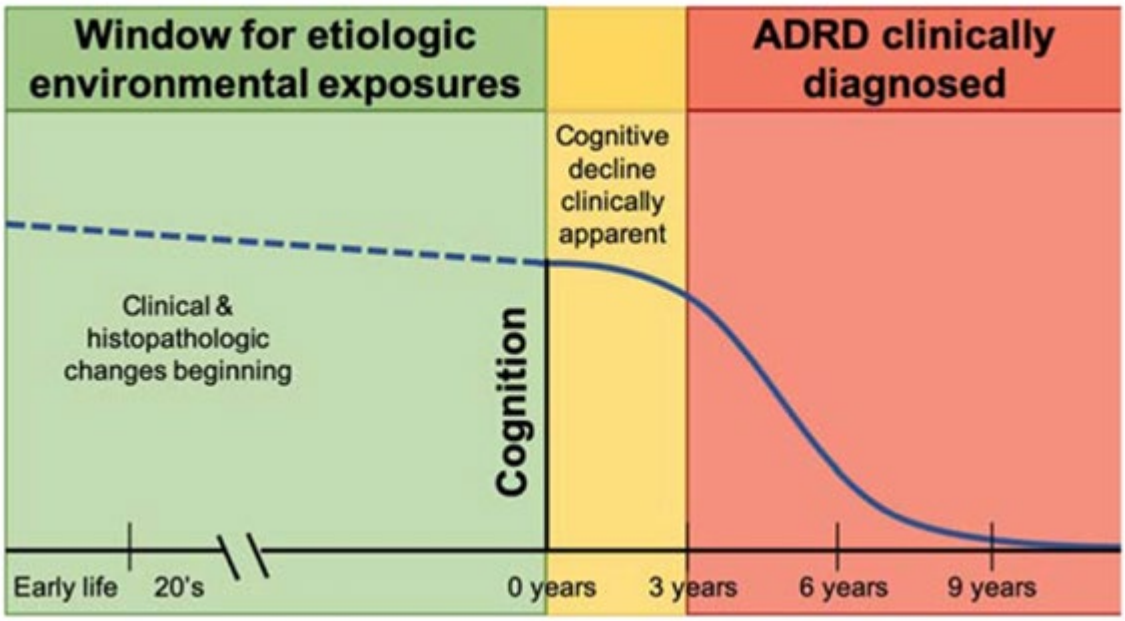


Рис. 1.4. Етіологічне вікно для впливу факторів навколишнього середовища, пов'язаних з хворобою Альцгеймера та пов'язаними з нею деменціями [47].

Докази нейротоксичності хімічних речовин навколишнього середовища у людей похилого віку накопичуються, а розуміння впливу довкілля на стан здоров’я хворих є важливим для подальшого лікування і профілактики AD.

За останні роки відбулися важливі досягнення в розумінні основної патології захворювання, виявленні численних причинних і захисних генів, ідентифікації нових біомаркерів крові та методів візуалізації, а також отримано перші обережні сигнали щодо позитивних ефектів хворобомодифікувального лікування та втручань, спрямованих на зміну способу життя. Важкі метали широко поширені та стійко зберігаються в навколишньому середовищі. Після впливу цих металів на організм вони здатні ефективно проникати в клітини та досягати головного мозку [48-50].

Деменція характеризується порушенням щонайменше одного когнітивного домену, включаючи пам’ять, мову, сприйняття, увагу, соціальне пізнання та виконавчі функції [51, 52]. Захворювання включає гетерогенну групу розладів, серед яких лобно-скронева деменція, судинна деменція та деменція з тільцями Леві. AD є поширеною формою деменції, на яку припадає 70% випадків деменції.

Три клінічні випадки, наведені в на фото ілюструють клінічний спектр хвороби Альцгеймера. Випадок А демонструє хворобу Альцгеймера, генетично детерміновану, відповідно до поточних глобальних ініціатив Dominantly Inherited Alzheimer Network та Alzheimer Prevention Initiative і пов'язаних із ними клінічних досліджень. Випадок В представляє мовний варіант хвороби Альцгеймера, який зазвичай виникає у молодшому віці (до 70 років), ілюструючи труднощі розпізнавання хвороби Альцгеймера у пацієнтів, для яких порушення пам’яті не є першою та найбільш вираженою ознакою. Випадок С є типовим амнестичним варіантом, що частіше спостерігається у пацієнтів віком понад 70 років, ілюструючи зростаючу популяцію осіб, уражених хворобою Альцгеймера та деменцією: людей похилого віку, які часто проживають самостійно та дедалі більше залежать від інших у догляді.

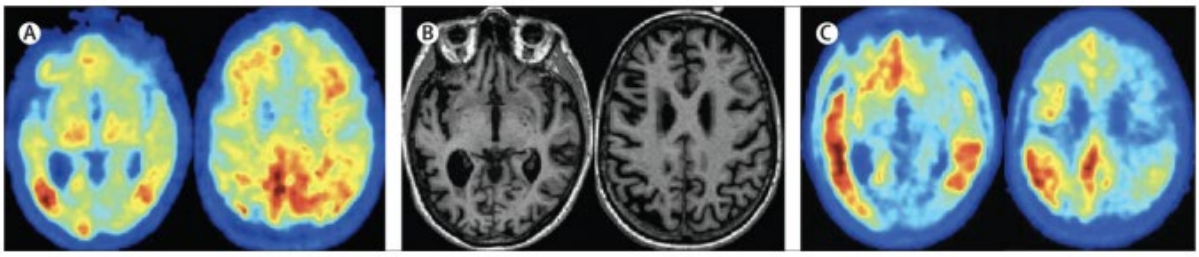


Рис. 1.5. (A) ПЕТ-сканування з використанням амілоїдного радіофармпрепарату Pittsburgh compound B демонструє відкладання амілоїду переважно в ділянці задньої поясної кори. (B) T1-зважені МРТ-зображення демонструють генералізовану кортикальну атрофію, зліва направо. (C) Зображення Tau-ПЕТ із використанням трасера AV1451 демонструє відкладання тау-білка в лівій нижньоскроневій частці, тім'яній частці та незначне відкладання в задній поясній корі [42].

Підходи до діагностики хвороби Альцгеймера еволюціонували від патологоанатомічної оцінки за часів Алоїза Альцгеймера до клінічних критеріїв, запропонованих у 1984 році National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke та Alzheimer's Disease and Related Disorders Association [53]. Надалі вони були доповнені комбінованими клініко-біологічними моделями International Working Group [54] та National Institute on Aging-Alzheimer's Association, що інтегрували біомаркери та сформували сучасну біологічну концепцію діагностики захворювання. Спочатку діагноз встановлювали лише на стадії деменції, яка характеризується прогресуючим когнітивним дефіцитом із втратою функціональної незалежності – ключовою ознакою, що відрізняє деменцію від легкого когнітивного порушення [55].

У зв'язку з розвитком галузі біомаркерів і прагненням зробити їх придатними для використання в діагностичній практиці Jack та співавтори [56] запропонували систему ATN: біомаркери категорії A (амілоїд), T (фосфорильований тау) та N (нейродегенерація, за можливості оцінювана за загальним тау). У цій дослідницькій концепції діагноз хвороби Альцгеймера

визначається наявністю амілоїду β та фосфорильованого тау. Наявність амілоїду β визначається як патологічні зміни, характерні для хвороби Альцгеймера, що ґрунтує дослідницький діагноз хвороби Альцгеймера виключно на доказах, отриманих за допомогою біомаркерів. Клінічні стадії можуть варіювати від когнітивно нормального стану до легкого когнітивного порушення та деменції, підкреслюючи безперервний характер хвороби Альцгеймера, яка розвивається протягом багатьох років. Концепція ATN підкреслює важливість амілоїду β та тау як визначальних характеристик хвороби Альцгеймера, відповідно пропонуючи, що діагноз хвороби Альцгеймера може бути встановлений лише на підставі біомаркерів, і чітко розмежовуючи поняття хвороба Альцгеймера та деменція.

Захворюваність і поширеність – У 2018 році Alzheimer's Disease International оцінила поширеність деменції приблизно у 50 мільйонів людей у світі, з прогнозом її триразового зростання до 2050 року, причому дві третини хворих проживатимуть у країнах із низьким і середнім рівнем доходу [40]. Найновіші дані свідчать, що поширеність деменції в Європі до 2050 року подвоїться [57]. Накопичені докази свідчать про те, що захворюваність на деменцію в країнах із високим рівнем доходу знижується [58], хоча докази щодо зниження її поширеності є менш переконливими.

Найважливішими встановленими факторами ризику розвитку хвороби Альцгеймера є похилий вік та носійство алеля ε4 гена аполіпопротеїну Е (APOE ε4) [59]. Водночас сучасні дослідження свідчать, що значний внесок у розвиток захворювання роблять і модифіковані фактори ризику, серед яких особливу увагу привертають чинники навколишнього середовища. Найбільш переконливі докази накопичено щодо забруднення атмосферного повітря, зокрема впливу твердих частинок ($PM_{2,5}$ і PM_{10}), продуктів горіння та лісових пожеж, а також токсичних важких металів [60]. Епідеміологічні й експериментальні дослідження свідчать, що тривалий вплив цих чинників асоціюється з підвищеним ризиком розвитку деменції та хвороби

Альцгеймера. Їх нейротоксична дія реалізується через індукцію оксидативного стресу, нейрозапалення, порушення функції гематоенцефалічного бар'єра, дисфункцію мітохондрій, накопичення β-амілоїду та патологічне фосфорилювання тау-білка. З огляду на потенційну модифікованість цих чинників, зменшення впливу забруднювачів довкілля розглядається як перспективний напрям профілактики нейродегенеративних захворювань.

Таким чином, сучасні дані свідчать, що поряд із генетичною схильністю важливу роль у розвитку хвороби Альцгеймера відіграють модифіковані екологічні фактори ризику. Забруднення атмосферного повітря, дрібнодисперсні тверді частинки та токсичні важкі метали здатні ініціювати низку патогенетичних процесів, зокрема оксидативний стрес, нейрозапалення, порушення функції гематоенцефалічного бар'єра, мітохондріальну дисфункцію та накопичення патологічних білків, що сприяють прогресуванню нейродегенерації. Серед важких металів особливий інтерес становить ртуть, яка характеризується високою нейротоксичністю, здатністю накопичуватися в тканинах центральної нервової системи та потенційною участю в молекулярних механізмах розвитку хвороби Альцгеймера.

1.2. Ртуть: джерела експозиції, токсикокінетика та механізми нейротоксичної дії

Ртуть є важким металом із відомою токсичністю, який спричинив масштабні катастрофи для громадського здоров’я у затоці Мінамата, Японія [61], та в Іраку [62]. Ртуть існує у декількох фізикохімічних формах: неорганічна ртуть, яка включає металеву ртуть і пари ртуті (Hg^0), меркурозні (Hg^{2++}) або меркуричні солі (Hg^{++}); та органічна ртуть, яка включає сполуки, у

яких ртуть зв’язана в складі вуглецевовмісних груп. Біологічна роль, фармакокінетика та клінічне вплив різних форм ртуті відрізняються залежно від хімічної структури та агрегатного стану: пари ртуті що потрапляють через дихальні шляхи легко адсорбуються через слизові оболонки та легені потім швидко окиснюються до інших форм ртуті; метилртуть має високу біодоступність та легко адсорбується через кишечник і накопичується у багатьох тканинах організму, але не здатна проходити через гематоенцефалічний бар’єр так ефективно, як наприклад елементарна ртуть [63]. Токсичність для людини змінюється залежно від форми ртуті, дози та швидкості експозиції. Органом-мішенню для вдихуваних парів ртуті переважно є головний мозок [64].

1.2.1. Джерела розповсюдження ртуті

Згідно з даними WHO [1], більшість випадків впливу ртуті на людину спричинені виділенням парів ртуті з амальгамних стоматологічних пломб, споживанням забрудненої риби або впливом професійної зайнятості.

У природі ртуть зустрічається переважно у вигляді елементарної ртуті або сульфіду ртуті та міститься у земній корі приблизно у концентрації 0,5 частин на мільйон. Наявність ртуті в атмосфері зумовлена виділення ртуті з гірських порід або через вулканічну активність [65].

Під час воєнних дій в Україні виникає велика кількість пожеж під час яких утворюється велика кількість твердих частинок. Згідно даних системи Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів «Екозагроза» [66], найбільшої шкоди внаслідок воєнних дій завдається саме атмосферному повітрю. Майже три мільйони гектарів лісу в Україні були охоплені війною від початку повномасштабного вторгнення. Численні вибухи призводять до виникнення лісових пожеж. Внаслідок обстрілів нафтобаз та промислових

підприємств в атмосферу потрапляють десятки шкідливих речовин, а також різних важких металів . Згоряння різних продуктів переробки нафти, рідкого вуглеводневого палива спричиняє також викиди ртуті в атмосферу.

Використання озброєння різних типів призводять до підвищення вмісту важких металів зокрема Hg^{2+}, а саме гримуча ртуть (фульмінат ртуті) від початку історії використовувалася у капсульних сумішах ініціюючих речовин для підпалювання пороху. Пари елементарної ртуті що знаходяться в атмосфері можуть осідати у воду, де мікроорганізми перетворюють її на органічну (метильну або етильну) ртуть, яку в свою чергу споживають дрібні організми, що зрештою стають їжею для більших риб. Риби, які перебувають на верхівці ланцюга харчування такі як тунець, риба-меч або різні види акул, можуть накопичувати значні концентрації ртуті у своїх тканинах.

Потрапляння ртуті в організм людини відбувається переважно через вдихання парів елементарної ртуті внаслідок професійної діяльності або впливу стоматологічних амальгам, або через споживання забруднених морепродуктів [64-67]. Менш поширеним джерелом парів ртуті є розлита ртуть, а в літературі описаний випадок ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури [68], спричиненої прибиранням пилососом розлитої ртуті (що призвело до значного гострого отруєння парами ртуті.

1.2.2. Фармакокінетика експозиції ртуттю

1) Елементарна або металева (Hg^0) ртуть. Після потрапляння в організм пари ртуті мають високу подібність до сульфгідрильних груп і зв’язуються із сірковмісними амінокислотами у всьому організму. Пари ртуті транспортуються до головного мозку або у розчиненому вигляді в сироватці крові, або шляхом приєднання до мембран еритроцитів. Металева ртуть легко проходить через гематоенцефалічний бар’єр мозку [69]. Відкладається

практично в усіх життєво важливих органах і тканинах, викликаючи порушення їх функціонування [70].

Ртуть також має спорідненість до сайтів зв'язування на поверхні Т-клітин і до сульфгідрильних груп, які впливають на функцію Т-клітин [71]. Ртуть легко накопичується у плаценті та тканинах плода і виявляється у грудному молоці [72]. Металева ртуть переважно виводиться у формі «меркуричної» ртуті. Періоди напіввиведення металевої та «меркуричної» ртуті значно варіюють [5], причому деякі депо (наприклад, центральна нервова система) мають період напіввиведення понад кілька років [63].

2) «Меркурозна» (Hg^{2++}) ртуть. «Меркурозна» сіль ртуті у формі Hg_2Cl_2 (каломель) є погано розчинною у воді та погано адсорбується кишечником, хоча вважається, що певна її частина піддається окисненню до форм, які легше абсорбуються [63]. Сумнівно, що «меркурозна» ртуть зберігається в організмі, за винятком ролі проміжної форми. Однак певна абсорбція очевидно відбувається, оскільки каломель іноді пов'язують із рожевою хворобою, або акродинією.

3) «Меркурична» (Hg^{++}) ртуть. Історично «меркуричний» хлорид ($HgCl_2$) використовували як консервант і для проявлення фотографічної плівки, а також він використовувався з метою самогубства. Він є компонентом деяких кремів для освітлення шкіри. Лише близько 2% перорально введеного «меркуричного» хлориду адсорбується [73]. Наявних даних щодо проникнення «меркуричної» ртуті через шкіру недостатньо для кількісного порівняння з пероральним надходженням або з металевою ртуттю. Подібно до металевої ртуті, «меркурична» ртуть у кровотоку приєднується до сульфгідрильних груп на еритроцитах, металотіонеїні або глутатіоні або перебуває у плазмі у суспендованому стані. «Меркурична» ртуть не проходить через гематоенцефалічний бар'єр ефективно, але накопичується у значній кількості у плаценті, тканинах плода та амніотичній рідині. Виведення «меркуричної» ртуті переважно відбувається через сечу та кал, хоча значні

кількості також виділяються через піт, сльози, грудне молоко та слину. Періоди напіввиведення, як і у випадку металевої ртуті, мають мультифазний характер [74, 75].

4) Органічні сполуки ртуті. Серед органічних сполук ртуті найбільш вивченою є метилртуть, яка надходить до організму переважно зі споживанням риби й інших морепродуктів. На відміну від інших органічних сполук ртуті, вона характеризується високою стабільністю та біодоступністю. Етилртуть має подібні клітинні механізми токсичної дії, однак елімінується значно швидше, а її період напіввиведення приблизно утричі коротший. Метилртуть ефективно адсорбується як через шлунково-кишковий тракт (понад 90 % після споживання забруднених харчових продуктів), так і через дихальні шляхи, тоді як її проникнення через шкіру є менш вираженим, але також можливим. Після надходження до кровотоку вона швидко зв'язується із сульфгідрильними (-SH) групами білків, утворюючи комплекси, які структурно нагадують метіонін. Саме це забезпечує її транспорт через мембранні переносники амінокислот і сприяє широкому розподілу в організмі. Найвищі концентрації виявляють у головному мозку, печінці, нирках, плаценті та тканинах плода, особливо в головному мозку плода. Період напіввиведення метилртуті в організмі людини становить у середньому близько 70 діб. Основним шляхом її елімінації є кишечник, через який виводиться близько 90 % сполуки, тоді як незначна частина екскретується із грудним молоком [74-77]. Диметилртуть також ефективно абсорбується через шкіру, і описаний випадок смерті науковця, спричиненої мінімальним контактом зі шкірою [78].

1.2.3. Токсичність ртуті

Ртуть у всіх формах порушує клітинні функції шляхом зміни третинної та четвертинної структури білків, а також шляхом зв'язування із сульфгідрильними та селеногідрильними групами. Отже, ртуть потенційно може порушувати функцію будь-якого органа або будь-якої субклітинної структури. Головним органом-мішенню для парів ртуті є головний мозок, однак також були описані порушення функції периферичних нервів, нирок, імунної системи, ендокринної системи та м'язів, а також декілька типів дерматиту [79]. При масивному гострому впливі парів ртуті ерозивний бронхіт і бронхіоліт, які потенційно можуть призвести до дихальної недостатності, можуть супроводжуватися симптомами з боку центральної нервової системи, такими як тремор або еретизм [80, 81].

Хронічний вплив клінічно значущих доз парів ртуті зазвичай спричиняє нейрологічну дисфункцію. За низькорівневого впливу були описані неспецифічні симптоми, такі як слабкість, втома, анорексія, втрата маси тіла та розлади з боку шлунково-кишкового тракту. Вищі рівні впливу пов'язані з ртутним тремором: тонкими м'язовими фасцикуляціями, які кожні декілька хвилин перериваються грубим тремтінням. Також може спостерігатися еретизм: виражені зміни поведінки та особистості, емоційна збудливість, втрата пам'яті, безсоння, депресія, втома, а у тяжких випадках – делірій і галюцинації. Були описані гінгівіт і рясне слиновиділення [82, 83]. Ці симптоми можуть регресувати після припинення впливу, однак у багатьох випадках цього не відбувається. Стійкі нейрологічні симптоми є поширеним явищем.

Ртуть, як вважається, порушує транскрипцію ДНК і синтез білків [84], включаючи синтез білків у мозку, що розвивається, із руйнуванням ендоплазматичного ретикулума та зникненням рибосом [85]. Ртуть спричиняє порушення функціонування численних субклітинних структур центральної

нервової системи та інших органів, зокрема мітохондрій, пригнічує синтез гему, порушує цілісність клітинних мембран, посилює утворення вільних радикалів і змінює функціонування нейромедіаторних систем, що призводить до ушкодження центральної та периферичної нервової системи [50, 71, 86]. Крім того, метилртуть асоціюється зі зниженням активності природних кілерів і порушенням балансу Th1/Th2, що може сприяти розвитку автоімунних процесів [87]. Також ртуть пов'язують із порушенням репарації ДНК та мітохондріальною дисфункцією, зумовленою її високою спорідненістю до сульфгідрильних груп білків окисного фосфорилювання, що розглядається як один із можливих механізмів розвитку синдрому хронічної втоми [84-87].

Таким чином, ртуть є одним із найнебезпечніших токсикантів довкілля, здатним накопичуватися в організмі та чинити системний токсичний вплив, насамперед на нервову систему. Особливості її токсикокінетики, висока біодоступність окремих хімічних форм і здатність індукувати оксидативний стрес, мітохондріальну дисфункцію та порушення клітинного метаболізму зумовлюють необхідність мінімізації надходження ртуті до організму. У зв'язку з цим важливого значення набуває розроблення та вдосконалення ефективних методів видалення сполук ртуті й інших важких металів із водного середовища та організму людини.

1.3. Видалення важких металів із води

Враховуючи негативний вплив важких металів на здоров’я людини, надзвичайно важливо здійснювати їх видалення з води та стічних вод, а також забезпечувати їхній постійний моніторинг і оцінювання [88]. Для видалення важких металів із забруднених природних і стічних вод [89] розроблено низку фізико-хімічних технологій, серед яких найбільш поширеними є іонний обмін, мембранні процеси, хімічне осадження, коагуляція-флокуляція, адсорбція та

електрохімічні методи [90]. Проте кожен із цих підходів має певні обмеження, зокрема недостатню селективність, зниження ефективності за низьких концентрацій металів, необхідність використання значної кількості реагентів і високі енергетичні витрати, а також утворення токсичних відходів, що потребують подальшої утилізації. Крім того, ефективність окремих технологій значною мірою залежить від фізико-хімічних властивостей водного середовища, концентрації забруднювачів, значення pH, складу стічних вод та інших технологічних параметрів. У зв'язку з цим дедалі більшу увагу приділяють розробленню нових високоселективних методів вилучення іонів важких металів із водних середовищ. Одним із перспективних напрямів є технологія хелатувальної екстракції, що ґрунтується на використанні органічних хелатувальних агентів [91], здатних утворювати міцні комплекси з катіонами важких металів і забезпечувати їх ефективне вилучення з води [88-92].

Потенційними хелатувальними агентами для зв'язування іонів важких металів є органічні сполуки, що містять функціональні групи з донорними атомами азоту, кисню або сірки, здатними утворювати координаційні зв'язки з катіонами металів. До таких груп належать, зокрема, амінні, амідні, карбоксильні, гідроксильні, тіольні та тіокарбамідні, які забезпечують утворення стійких хелатних комплексів [93].

Можливість цілеспрямованого синтезу лігандів із заданими координаційними властивостями, здатних утворювати стабільні комплекси навіть за низьких концентрацій металів, робить хелатувальну екстракцію одним із перспективних підходів до очищення природних і стічних вод. У зв'язку з цим значну увагу приділяють модифікації структури лігандів та створенню нових хелатувальних систем із підвищеною селективністю, стабільністю комплексів і високою ефективністю вилучення цільових металів. На практиці вилучення важких металів із водних середовищ за допомогою

хелатувальних агентів найчастіше здійснюють методами рідинно-рідинної екстракції або твердофазної екстракції [89-94].

1.3.1. Детоксикація важких металів в забруднених водах та в організмі

Під час рідинно-рідинної екстракції розчин хелатувального агента у водонерозчинному органічному розчиннику контактує з водною фазою, що містить іони важких металів. У процесі перемішування між фазами встановлюється рівновага, внаслідок чого утворені хелатні комплекси переходять із водної фази в органічну. Після досягнення рівноваги органічну та водну фази розділяють. Типову схему процесу рідинно-рідинної екстракції наведено на **рисунку 1.6**. Для досягнення високого ступеня вилучення важких металів зазвичай застосовують кілька послідовних стадій екстракції, а для вилучення металів із навантаженої органічної фази – стадію реекстракції (stripping) [95-94].

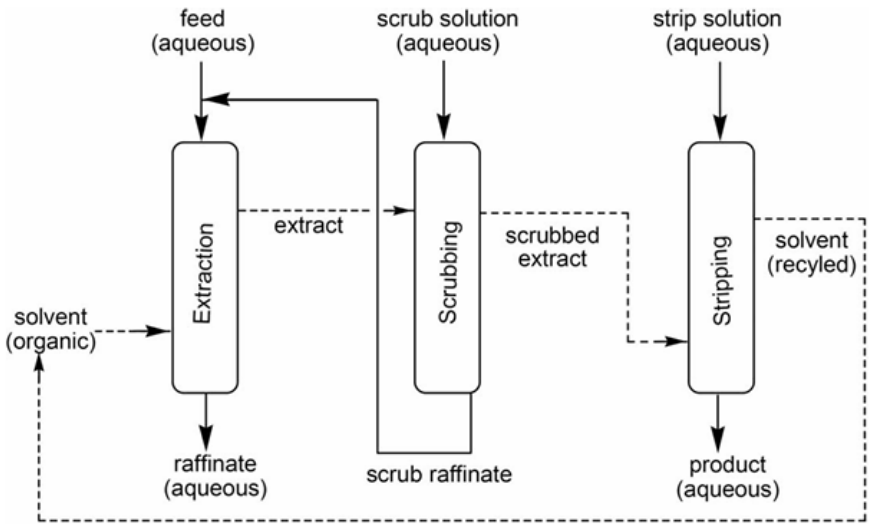


Рис. 1.6. Схематична діаграма типового процесу екстракції розчинником [95].

До основних переваг належать висока селективність щодо цільових іонів, можливість багаторазової регенерації екстрагента, відносно невеликі експлуатаційні витрати та придатність до масштабування в промислових умовах. Завдяки цим перевагам рідинно-рідинна екстракція широко застосовується для вилучення й розділення іонів кольорових, рідкісноземельних і важких металів, зокрема Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) та інших, як у гідрометалургії, так і в технологіях очищення промислових стічних вод.

На жаль, хоча екстракція розчинником є простим і швидким методом, більшість доступних хелатувальних агентів недостатньо специфічно зв'язуються з цільовими іонами металів і не утворюють стабільних комплексів. Унаслідок цього утворені комплекси руйнуються та вивільняють важкі метали у навколишнє середовище. Диметилдитіокарбамат натрію (SDTC) і тіокарбонат натрію (STC) є двома прикладами часто використовуваних комерційних реагентів [94-96].

Також лабораторні дослідження показали, що ці речовини мають високі показники вилуговування, можуть розкладатися на небезпечні хімічні сполуки під час хелатування, потребують застосування доз, вищих за стехіометричні значення, і є неефективними за рівнів pH нижче 4,0. Ці сполуки також викликають занепокоєння через їхню обмежену здатність до зв'язування з важкими металами, що спричиняє їхній розпад і повторне надходження важких металів до екосистеми протягом змінного, але часто короткого періоду часу. Дані літературних джерел щодо SDTC і STC свідчать, що комбінації «реагента-метал» можуть легко розкладатися з утворенням інших матеріалів, таких як нерозчинних сульфідів металів (HgS) [97].

Був розроблений [98] тіольний піридиновий ліганд DTPY, який містить два замісники у положеннях 2 і 6 із трьохвуглецевими ланцюгами, одним атомом нітрогену та двома кінцевими сірковмісними групами, що забезпечують високу стабільність метал-лігандних комплексів. Стабільність

комплексів зумовлена координаційною взаємодією катіонів металів M^{2+} з атомами сірки та нітрогену ліганду. Показано, що DTPY ефективно осаджує кадмій і мідь: за збільшення дози ліганду на 8,32 % вилучення кадмію з розчину концентрацією 50 ppm досягало 99,70 % протягом 1 год при pH 6,0, тоді як ступінь видалення міді перевищував 99,98 % за 1 год при pH 4,5 із розчину тієї ж концентрації.

У іншому дослідженні було встановлено, що алкілтіольні хелати є ефективними для осадження ртуті з води та утворюють стабільні осади [99]. Був синтезований [100] новий хелатувальний агент N^1,N^2,N^4,N^5-тетракіс(2-меркаптоетил)бензен-1,2,4,5-тетракарбоксамід (TMBTCA), запропонований для вилучення іонів міді зі стічних вод. У порівняльних дослідженнях TMBTCA продемонстрував вищу спорідненість до іонів Cu(II) і Cd(II) порівняно з комерційними осаджувальними реагентами. Крім того, утворені комплекси характеризувалися високою хімічною стабільністю.

У дослідженні [101] було оцінено екстракційні властивості низки фенокси-іміно лігандів, які виявили високу ефективність щодо вилучення іонів Cu(II), Zn(II), Pb(II) та Cd(II) із водних розчинів, при цьому найбільшу спорідненість вони проявляли до іонів Cu(II). Отримані результати свідчать про перспективність використання фенокси-іміно лігандів для селективного вилучення міді та цинку зі стічних вод. Встановлено, що ефективність екстракції визначається природою іона металу, молекулярною будовою ліганду та закономірностями, описаними рядом Ірвінга-Вільямса.

Хелатувальна терапія є визнаним методом лікування гострих отруєнь ртуттю. Одним із найбільш ефективних хелаторів є 2,3-димеркапто-1-пропансульфонова кислота (DMPS), застосування якої продемонструвало ефективне усунення нейрологічних симптомів у пацієнтів із ртутною інтоксикацією. Отримані результати підтверджують ефективність хелатної терапії як засобу детоксикації ртуті та зменшення її нейротоксичних ефектів [102].

Однак, її клінічне застосування обмежується переважно випадками гострих або тяжких інтоксикацій через можливі побічні ефекти, недостатню селективність окремих хелаторів та ризик одночасного виведення есенціальних мікроелементів. У свою чергу, хелатувальна екстракція є одним із найефективніших підходів до селективного вилучення важких металів із водних середовищ завдяки можливості цілеспрямованого проєктування лігандів із високою спорідненістю до певних іонів металів. Водночас широке практичне застосування цього методу обмежується необхідністю використання значних обсягів органічних розчинників, їх токсичністю, пожежонебезпечністю та екологічними ризиками. Незважаючи на розроблення нових «зелених» розчинників, їх складність одержання та висока вартість зумовлюють актуальність пошуку альтернативних технологій вилучення важких металів, які поєднували б високу селективність, ефективність і екологічну безпечність.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Реактиви та матеріали

В роботі були використані наступні матеріали та реактиви: HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid), «Fluka» (Швейцарія); амінооксиоцтова кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), «Calbiochem» (США); компоненти інкубаційного середовища нервових терміналей, сцинтиляційна рідина Sigma-Fluor High Performance LSC Cocktail «Sigma» (США); фіколл-400, [^{3}H]ГАМК (γ-[2,3-^{3}H(N)]-аміномасляна кислота) та L-[^{14}C]глутамат «Perkin Elmer» (США).

2.1.1. Етичні норми

Експерименти на тваринах виконували відповідно до європейських та міжнародних нормативних вимог щодо використання лабораторних тварин. Усі дослідження в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України проводили згідно з «Правилами проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затвердженими Комісією з догляду, утримання й використання експериментальних тварин (протокол № 1 від 16.02.2024). Дослідження проводили на самцях білих щурів лінії Wistar, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

2.2. Методи

2.2.1. Аналіз препаратів диму за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії

Розмір частинок диму з суміші деревини визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії на спектрометрі Zetasizer-3 (Malvern Instruments, United Kingdom), оснащеному гелій-неоновим лазером (25 мВт, λ=633 нм). (Суміш деревини складалася з гілок тополі та гілок верби лозової у співвідношенні один до одного). Вимірювання проводили в діапазоні 1 нм - 50 мкм, використовуючи 1 мл суспензії диму в кварцовій кюветі діаметром 10 мм за температури +22 °C. Реєстрацію динамічно розсіяного світла під кутом 90° здійснювали протягом 120 с. Обробку даних виконували за допомогою програмного забезпечення PCS-Size Mode v1.61; прилад був оснащений корелятором типу 7032 CE. За результатами вимірювань було отримано розподіл частинок за їх кількістю. Аналіз профілю розподілу показав, що досліджувані препарати переважно містили частинки із середнім розміром близько 30 нм.

2.2.2. Виділення синаптосом з головного мозку щурів

Синаптосоми виділяли за методом Котмана [103] із незначними модифікаціями. Середовище виділення містило 0,32 М сахарози, 5 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 0,2 мМ EDTA. Гомогенат послідовно центрифугували: спочатку при 2500 g протягом 5 хв для видалення ядер, кровоносних судин і клітинного детриту, а надосадову фракцію – при 15000 g упродовж 12 хв для одержання фракції неочищених синаптосом (P2-фракцію). Осад ресуспендували в середовищі виділення, наносили на градієнт фіколу та центрифугували при 70000 g протягом 45 хв. Очищену фракцію синаптосом ресуспендували у стандартному сольовому розчині, який містив (в мМ): NaCl, 126; KCl, 5; $CaCl_2$,

2; $MgCl_2$, 1.4; NaH_2PO_4, 1.0; HEPES-NaOH, 20, pH 7.4; D-glucose, 10. Всі операції проводили при 0-4°С. Концентрацію протеїну визначали за методом Ларсона [104].

2.2.3. Визначення вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом

Суспензію синаптосом доводили стандартним сольовим розчином до концентрації 1 мг протеїну/мл. Після 10-хвилинної преінкубації при 37 °С синаптосоми інкубували протягом 10 хв у стандартному сольовому розчині з L-[^{14}C]глутаматом (500 нМ; 238 мСі/ммоль). Надалі аліквоти навантаженої суспензії об'ємом 120 мкл, що містили 25-30 мкг протеїну, преінкубували при 37 °С упродовж 8 хв, після чого до них додавали відповідні аліквоти препаратів ртуті, твердих частинок диму та ін. та продовжували інкубацію ще 10 хв. Нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом у безкальцієвому середовищі реєстрували протягом 6 хв. Після завершення інкубації синаптосоми швидко осаджували центрифугуванням у мікроцентрифузі при 10000 g протягом 20 с. Аліквоти надосадової фракції (90 мкл) та осаду, попередньо солюбілізованого додецилсульфатом натрію (90 мкл), змішували з 1,5 мл сцинтиляційної рідини Sigma-Fluor® High Performance LSC Cocktail, після чого радіоактивність визначали на сцинтиляційному лічильнику Tracor Analytic Delta 300 (США). Загальний рівень радіоактивності розраховували як суму радіоактивності, виміряної у надосадовій фракції та солюбілізованому осаді [105].

2.2.4. Визначення вивільнення [^{3}H]ГАМК з синаптосом

Синаптосоми з концентрацією протеїну 2 мг/мл інкубували у стандартному сольовому розчині, що містив 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти, у присутності $5x10^{-7}$М (0,1 Кі/мл) [^{3}H]ГАМК протягом 5 хв при 37 °С.

Після цього суспензію трикратно розводили охолодженим сольовим розчином і центрифугували при 4000 g упродовж 5 хв. Отриманий осад ресуспендували у сольовому розчині з 10 мкМ амінооксиоцтової кислоти до кінцевої концентрації протеїну 1 мг/мл. Аліквоти суспензії об'ємом 120 мкл преінкубували при 37 °С протягом 8 хв, після чого додавали відповідні аліквоти препаратів ртуті, твердих частинок диму та ін. та продовжували інкубацію ще 10 хв. Далі зразки інкубували 1-5 хв і осаджували синаптосоми центрифугуванням у мікроцентрифузі Eppendorf при 10000 g протягом 20 с. Радіоактивність [^{3}H]ГАМК , вивільненої в супернатант, визначали в аліквотах об'ємом 90 мкл за допомогою сцинтиляційного лічильника Delta 300. Вивільнення міченої ГАМК виражали у відсотках від загального вмісту [^{3}H]ГАМК у синаптосомах [106].

2.2.5. Визначення накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами

Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами визначали після попередньої преінкубації суспензії з концентрацією протеїну 250 мкг/мл при 37 °С протягом 8 хв. Далі до зразків вносили відповідні аліквоти препаратів ртуті, твердих частинок диму та ін. та інкубували ще 10 хв. Реакцію розпочинали додаванням суміші неміченого L-глутамату і L-[^{14}C]глутамату (0,1 мкКі/мл 251 мКи/ммоль), після чого інкубацію продовжували при 37 °С. Через 1-10 хв відбирали аліквоти, які негайно центрифугували в мікроцентрифузі Eppendorf при 10000 g протягом 20 с. Радіоактивність визначали в аліквотах надосадової фракції (100 мкл) та осаду, попередньо солюбілізованого в SDS, за допомогою сцинтиляційного лічильника Delta 300. Кількість поглинутого синаптосомами глутамату визначали, використовуючи данні по активності міченого препарату (251 мКі/ммоль) [107].

2.2.6. Визначення накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами

Для дослідження акумуляції [^{3}H]ГАМК синаптосомами використовували стандартний сольовий розчин, доповнений 100 мкМ амінооксиоцтової кислоти. Концентрація протеїну синаптосом у реакційній суміші становила 200 мкг/мл при загальному об'ємі проби 0,6 мл. Суспензію синаптосом попередньо інкубували при 37 °С протягом 5 хв, після чого додавали відповідні аліквоти препаратів ртуті, твердих частинок диму та ін. та продовжували інкубацію ще 10 хв. Акумуляцію [^{3}H]ГАМК ініціювали внесенням суміші неміченої ГАМК (1 мкМ) і [^{3}H]ГАМК (50 нМ; 0,2 мкКі/мл). Через 1 та 5 хв від початку реакції аліквоти об'ємом 0,5 мл фільтрували через скловолоконні фільтри GF/C. Після дворазового промивання охолодженим стандартним сольовим розчином фільтри висушували, а рівень радіоактивності визначали у сцинтиляційній рідині OCS за допомогою сцинтиляційного лічильника Delta 300 («Tracor Analytic», США) [107].

2.2.7. Визначення мембранного потенціалу

Мембранний потенціал ізольованих нервових закінчень визначали за допомогою потенціал-чутливого флуоресцентного зонда родаміну 6G. Флуоресцентні вимірювання проводили на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4 при довжині хвилі збудження 528 нм та реєстрації емісії на 551 нм (ширина щілин – 5 нм). До суспензії синаптосом (0,15 мг протеїну/мл), що знаходилася у кюветі з магнітним перемішуванням, вносили родамін 6G до кінцевої концентрації 0,5 мкМ і реєстрували зміну інтенсивності його флуоресценції до встановлення стаціонарного рівня (F_t). Після цього додавали досліджувані сполуки, реєстрували кінетику вивільнення барвника та нове стаціонарне значення флуоресценції. Величину мембранного потенціалу оцінювали за

індексом $F= F_t/F_0$, де F_t та F_0 – інтенсивність флуоресценції родаміну 6G у присутності та за відсутності синаптосом відповідно [106].

2.2.8. Визначення ацидифікації синаптичних везикул

Для дослідження закислення синаптичних везикул був використаний pH-чутливий флуоресцентний зонд акридиновий оранжевий (АО), який здатний накопичуватись у кислих компартментах клітин згідно pH-градієнту. Зміни інтенсивності флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi MPF-4, на довжинах хвиль збудження та емісії 490 та 530 нм, відповідно (ширина щілин по 5 нм) в термостатованій кюветі (при 37°С) при постійному перемішуванні [106].

2.2.9. Оптимізація методології синтезу препаратів суспендованих у воді твердих частинок диму від згоряння суміші деревини

У процесі спалювання біомаси утворюється аерозоль, основними компонентами якого є чорний та органічний вуглець. Зразки диму, отриманого при спалюванні суміші деревини, відбирали в лабораторних умовах у режимі реального часу під час активної фази горіння та фази тління. Концентрацію аерозольних частинок контролювали за допомогою монітора якості повітря PM2.5 Monitor / SDL607 (Mini Laser Air Quality Monitor).

Для проведення біотоксикологічних досліджень *in vitro* препарати аерозолю диму готували шляхом суспендування його компонентів у бідистильованій воді. Для цього спалювали 14 г суміші деревини, після чого відбирали 4000 мл димового аерозолю та абсорбували його компоненти у 5 мл бідистильованої води. Ефективність перенесення аерозольних компонентів у водну фазу становила близько 60 %, що було розраховано за зміною

концентрації частинок PM2.5 до (750 мкг/м^3) і після (470 мкг/м^3) процедури суспендування, визначеною за допомогою монітора PM2.5 Monitor / SDL607.

Отримані водно-суспендовані препарати аерозолю висушували для визначення концентрації твердих частинок. Середня концентрація частинок з суміші деревини у препаратах, використаних для біотоксикологічних експериментів, становила 1 мг/мл. Оптична густина водних суспензій при довжині хвилі 400 нм дорівнювала 0,45 OD відносно H_2O. Встановлено, що цей показник може бути використаний як простий і відтворюваний критерій для стандартизації та нормалізації препаратів димового аерозолю під час проведення біотоксикологічних досліджень, а також для оцінки аерозольних зразків у процесі моніторингу стану навколишнього середовища.

2.2.10. Статистичний аналіз даних

Отримані дані наведено у вигляді середнього значення ± стандартної похибки середнього (SEM) для n незалежних експериментів. Статистичний аналіз відмінностей між групами проводили за допомогою одно- та двофакторного дисперсійного аналізу (one-way ANOVA та two-way ANOVA). Після двофакторного дисперсійного аналізу для множинних порівнянь застосовували post hoc тест Тьюкі. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Обробку експериментальних даних, побудову графіків і математичні розрахунки виконували з використанням програми Microsoft Excel.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз впливу Hg^{2+} на транспортування збуджуючого нейротрансмітера L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях головного мозку щурів, зокрема початкову швидкість і акумуляцію L-[^{14}C]глутамату, його позасинаптосомальний рівень та тонічне вивільнення

Ртуть (Hg) належить до найбільш небезпечних глобальних забруднювачів довкілля, що відзначено Всесвітньою організацією охорони здоров'я [1]. Надходження цього металу в навколишнє середовище відбувається як із природних, так і з антропогенних джерел. Основна частка антропогенних викидів пов'язана зі спалюванням кам'яного та побутового вугілля, яке містить природні домішки ртуті. Унаслідок цього ртуть забруднює атмосферне повітря, ґрунти та поверхневі води, що створює умови для її потрапляння в організм людини. За рекомендаціями ВООЗ (2012) [109], допустиме тижневе надходження неорганічної ртуті становить 4 мкг/кг маси тіла. Водночас у дорослих осіб у шлунково-кишковому тракті адсорбується приблизно 10–15 % спожитої неорганічної ртуті [108, 109]. Вплив ртуті супроводжується розвитком тяжких порушень здоров'я, проте молекулярні та клітинні механізми її токсичної дії досі залишаються недостатньо з'ясованими. Неврологічні захворювання є однією з провідних причин інвалідизації та передчасної смертності, хоча їх етіологія значною мірою залишається невстановленою [110, 111]. Однією з основних мішеней токсичної дії неорганічної ртуті є центральна нервова система (ЦНС). Її вплив асоціюється з розвитком емоційної лабільності, делірію, головного болю, порушень пам'яті, безсоння, анорексії, підвищеної втомлюваності та тремору. У дітей інтоксикація неорганічною ртуттю може супроводжуватися

затримкою психомоторного розвитку, регресом набутих навичок, порушеннями сну, емоційними розладами та проявами автоагресивної поведінки [108].

Ртуть здатна порушувати різні ланки глутаматергічної нейротрансмісії. Показано, що зниження життєздатності клітин, індуковане $HgCl_2$, суттєво послаблюється за наявності антагоніста N-метил-D-аспартатних (NMDA) рецепторів, що свідчить про залучення глутаматергічних механізмів до реалізації її нейротоксичної дії. Встановлено також, що метилртуть (MeHg) характеризується вищою нейротоксичністю порівняно з $HgCl_2$, а загибель нейронів, спричинена сполуками ртуті, значною мірою пов'язана з розвитком глутамат-опосередкованої ексайтотоксичності. У мікромолярному діапазоні концентрацій як MeHg, так і $HgCl_2$ посилювали вивільнення глутамату, пригнічували його захоплення, знижували функціональну активність мітохондрій і вміст АТФ у культурі гранулярних клітин мозочка миші. Незважаючи на отримані дані, молекулярні механізми, що лежать в основі ртуть-індукованої глутаматергічної ексайтотоксичності та нейродегенерації, досі залишаються остаточно не з'ясованими [112, 113].

3.1.1. Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими закінченнями в присутності Hg^{2+}

Встановлено, що Hg^{2+} ($HgCl_2$) у концентрації 5 мкМ не змінювала ні початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату, ні його акумуляції синаптосомами протягом 10 хв (**табл. 3.1**). Водночас підвищення концентрації Hg^{2+} до 10 мкМ супроводжувалося зниженням обох досліджуваних показників. Отримані результати свідчать, що гострий інгібувальний вплив Hg^{2+} на накопичення L-[^{14}C]глутамату в синаптосомах проявляється,

починаючи з концентрації 10 мкМ, і характеризується зменшенням як початкової швидкості транспорту, так і загального рівня акумуляції глутамату.

Таблиця 3.1.

Опосередковане транспортером накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими закінченнями в присутності Hg^{2+}у різних концентраціях

Концентрація Hg^{2+} в інкубаційному середовищі нервових закінчень (мкМ)	Початкова швидкість накопичення L-[^{14}C]глутамату нервовими закінченнями (нмоль/хв/мг протеїну)	F; *p*-значення	Акумуляція L-[^{14}C]глутамату протягом 10 хв нервовими закінченнями (нмоль/мг протеїну)	F; *p*-значення
0 (контр.)	2,31 ± 0,12		9,43 ± 0,29	
1,0	2,34 ± 0,19	$F_{(1,22)} = 0,01$; $p = 0,91$; n.s.	9,52 ± 0,27	$F_{(1,22)} = 0,05$; $p = 0,81$; n.s.
2,5	2,43 ± 0,14	$F_{(1,22)} = 0,44$; $p = 0,51$; n.s.	9,32 ± 0,35	$F_{(1,22)} = 0,06$; $p = 0,79$; n.s.
5,0	2,37 ± 0,17	$F_{(1,22)} = 0,09$; $p = 0,76$; n.s.	8,87 ± 0,37	$F_{(1,22)} = 1,56$; $p = 0,22$; n.s.
10,0	1,47 ± 0,21**	$F_{(1,22)} = 13,49$; $p < 0,01$	5,84 ± 0,38***	$F_{(1,22)} = 62,31$; $p < 0,001$
20,0	0,54 ± 0,16***	$F_{(1,22)} = 87,31$; $p < 0,001$	3,31 ± 0,34***	$F_{(1,22)} = 206,98$; $p < 0,001$

Дані аналізували за допомогою one-way ANOVA. Дані є середніми ± SEM. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з відповідним контролем; n = 12.

3.1.2. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg^{2+}

Надмірне накопичення глутамату в синаптичній щілині є одним із ключових чинників розвитку ексайтотоксичності та подальшої загибелі нейронів [115]. Як показано в **табл. 3.2**, Hg^{2+} дозозалежно підвищувала позасинаптосомальний ий рівень L-[^{14}C]глутамату в синаптосомах у діапазоні концентрацій 0,5-20 мкМ, при цьому ефект зростав від практично повної відсутності до максимального значення. Встановлено, що концентрації Hg^{2+}, які змінювали позасинаптосомальний вміст L-[^{14}C]глутамату (**табл. 3.2**), відповідали концентраціям, за яких спостерігалося пригнічення його накопичення синаптосомами (**табл. 3.1**).

Таблиця 3.2

Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg^{2+} 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 аналізували за допомогою one-way ANOVA. Дані є середніми ± SEM. **, p < 0,01; ***, p < 0,001, n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з контролем; n = 12.

Отже, пригнічення накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами під дією Hg^{2+} супроводжувалося підвищенням його позасинаптосомального рівня. Найбільш виражені зміни цього показника при додаванні 5 мкМ Hg^{2+} спостерігалися протягом перших 5 хв інкубації, тоді як подальше інкубування синаптосом із Hg^{2+} викликало лише незначне додаткове збільшення позаклітинної концентрації L-[^{14}C]глутамату. Таким чином, Hg^{2+} впливала на глутаматергічний транспорт у синаптосомах, спричиняючи гостре підвищення позасинаптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату.

Вплив Hg^{2+} на тонічне вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом досліджували за присутності специфічного інгібітора транспортерів глутамату DL-трео-β-бензилоксіаспартату (DL-TBOA). DL-TBOA у концентрації 100 мкМ пригнічував накопичення L-[^{14}C]глутамату приблизно на 80 %. За цих умов транспорт L-[^{14}C]глутамату в цитозоль через глутаматні транспортери блокується, що дає змогу визначити величину тонічного вивільнення глутамату з пресинаптичних нервових закінчень. Встановлено, що додавання 5 мкМ Hg^{2+} не викликало статистично значущих змін тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом. Частка вивільненої радіоактивної мітки становила 44,51 ± 1,45 % від її загального накопичення у присутності 5 мкМ Hg^{2+} та 43,09 ± 1,23 % за одночасної присутності 5 мкМ Hg^{2+} і 100 мкМ DL-TBOA [$F(1,22) = 0,60$; $p = 0,44$; $n = 12$]. Отримані результати свідчать, що Hg^{2+} у концентрації 5 мкМ не впливає на тонічне вивільнення L-[^{14}C]глутамату із синаптосом, а також не порушує цілісності плазматичної мембрани та її проникності для молекул глутамату.

Таким чином, індуковане 5 мкМ Hg^{2+} підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату було зумовлене пригніченням функціональної активності транспортерів глутамату, а не збільшенням тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату з пресинаптичних нервових закінчень. Отже, ексайтотоксичне зростання позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових терміналей під дією 5 мкМ Hg^{2+} було використано як адекватний синаптичний показник для моніторингу змін у нервових терміналях, опосередкованих ефектами Hg^{2+} за впливу вуглецевих частинок – забруднювачів атмосферного повітря – у подальших експериментах.

3.1.3 Агрегація синаптосом за дії ртуті

Було досліджено потенційну агрегацію синаптосом за дії ртуті. В основу запропонованого підходу покладено принцип класичної оптичної агрегометрії, який ґрунтується на реєстрації змін оптичних показників, що виникають у процесі агрегації тромбоцитів після додавання відповідного індуктора. Подібність фізичних характеристик тромбоцитів і синаптосом, зокрема їхніх розмірів (близько 2 мкм), дала можливість адаптувати цей метод для дослідження агрегації синаптосом.

Агрегацію синаптосом досліджували за допомогою оптичного (турбідиметричного) агрегометра Solar AP2110 (США). До 400 мкл буфера Кребса-Рінгера додавали 10 мкл суспензії синаптосом, після чого вносили досліджувану речовину та реєстрували зміни світлопропускання суспензії.

Тестування розробленого методу проводили з використанням іонів Hg^{2+} у вигляді $HgCl_2$ у концентраціях 5, 10 і 15 мкМ (**рис.3.7**). Контрольні досліди виконували за відсутності додавання ртуті. Було показано, що ртуть викликає агрегацію синаптосом і цей ефект є дозо-залежним.

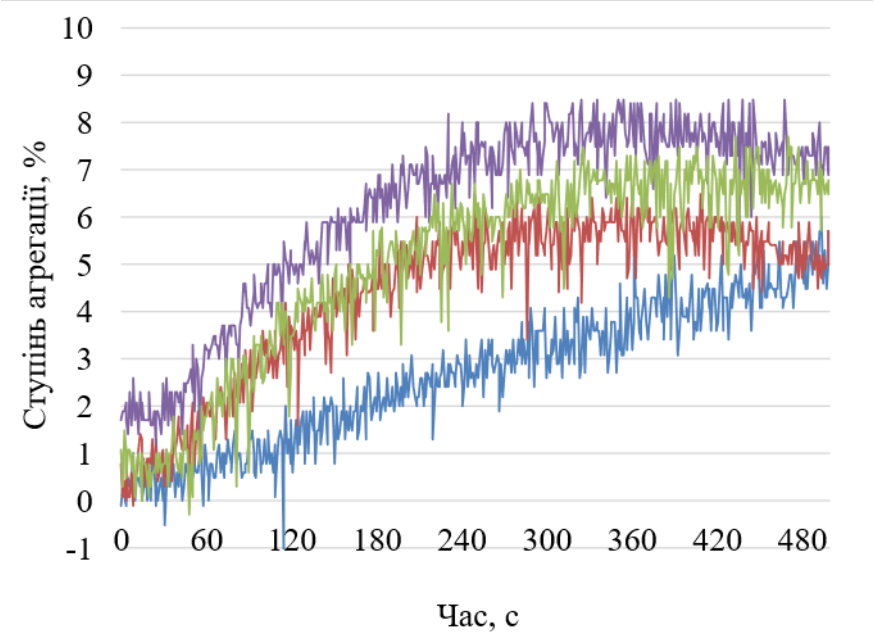


Рис. 3.1. Ступінь агрегації (%) синаптосом головного мозку при додаванні $HgCl_2$ в концентраціях: 5 (червона крива), 10 (зелена крива) і 15 мкМ (фіолетова крива) і контроль (синя крива).

Отримані результати підтвердили можливість застосування агрегометричного підходу для дослідження реакції синаптосом за умови впливу важких металів. Крім того, цей адекватний синапичний показник може бути у подальшому використаний як для швидкої оцінки впливу різних важких металів на нервові закінчення головного мозку, так і для оцінки адсорбувальних властивостей різних сполук або наночастинок - потенційних хелаторів. Для цього їх необхідно попередньо змішувати з іонами металу та інкубувати протягом 10-30 хв, після чого отриману суміш додавати до реакційної системи і визначати її вплив на агрегацію синаптосом (метод знаходиться у процесі розробки та верифікації з перспективою патентування).

3.2. Дослідження модуляторного впливу класичних молекулярних хелаторів, вуглецевих точок та наноалмазів на Hg^{2+}-індуковані ефекти у нервових терміналях

3.2.1 Зниження дії Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень класичними молекулярними відновниками та хелатуючими агентами

В наступній серії експериментів було оцінено адекватність запропонованого біологічного підходу для моніторингу змін ефектів Hg^{2+}, спричинених різними сполуками або частинками. Вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень може бути зумовлений взаємодією іонів Hg^{2+} з SH-групами мембранних протеїнів (транспортерів глутамату).

Дійсно, комбіноване застосування 5 мкМ Hg^{2+} і 1 мМ реагенту, що слугує для підтримки SH-груп у відновленому стані – дитіотреїтолу (DTT) значно зменшило Hg^{2+}-опосередковані ефекти, як показано в **таблиці 3.3**.

1 мМ хелатоутворювачу, який використовується для створення комплексів, – етиленглікольбіс(2-аміноетил)тетраоцтової кислоти (EGTA) значно зменшив вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень (**Таблиця 3.3**). Двофакторний дисперсійний аналіз виявив значну взаємодію між Hg^{2+} і DTT [$F_{(1,44)} = 156$; $p < 0,001$; $n = 12$] і між Hg^{2+} (5 мкМ) і EGTA [$F_{(1,44)} = 170$; $p < 0,001$; $n = 12$].

Таблиця 3.3

Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень під час комбінованого застосування Hg^{2+}, 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 аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу 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.

Таким чином, DTT і EGTA знизили вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень, і таким чином адекватність підходу моніторингу була перевірена.

3.2.2. Вплив вуглецевих точок, синтезованих з лимонної кислоти та сечовини, на ексайтотоксичність, спричинену ртуттю

На основі вищезазначеного підходу важливо було оцінити комбінований вплив на нервові закінчення вуглецевих точок та Hg^{2+}. Вуглецеві точки (CD) були синтезовані з органічних метаболітів тваринного та рослинного походження, а саме з лимонної кислоти, сечовини та β-аланіну, як аналоги PM, згідно з процедурою, описаною в [116, 117]. За допомогою високотемпературної обробки були виготовлені CD. Їх синтез починали зі змішування у фарфоровому тиглі 0,2 г лимонної кислоти та 0,25 г сечовини (cuCDs), або 0,5 г β-аланіну (aCDs), потім сполуки розводили в 5 мл дистильованої води та розчин нагрівали в печі при 190°C протягом 2 годин, внаслідок чого відбувалося випаровування води та утворювався чорний осад. Кінцеві продукти збирали, додаючи в тигель 10 мл дистильованої води, після чого центрифугували при 9000 g протягом 10 хв. Для отримання точної концентрації CD супернатанти висушували до досягнення постійної маси. Продукти розчиняли в дистильованій воді або буфері Рінгера для приготування зразків CD різної концентрації. У попередніх дослідженнях були з'ясовано властивості синтезованих наночастинок [116, 117].

Розчинені у воді наночастинки вуглецю мають неорганічне вуглецеве ядро з sp^2-гібридизованих графенових острівців, які включають sp^3-гібридизовані алмазоподібні елементи. Аморфний вуглець і оксигеновмісні полярні групи являють собою оболонку. За допомогою спектрофотометра Perkin Elmer Lambda-bio, контролювали спектри флуоресценції частинок, а спектри поглинання отриманих cuCDs записували за допомогою спектрофлуориметра QuantaMaster 40, PTI (Канада).

CuCDs використовували в концентраціях 1 і 10 мг/мл. Аналіз позасинаптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень при комбінованому застосуванні cuCDs і Hg^{2+} показав, що cuCDs

послаблюють індуковане Hg^{2+} ексайтотоксичне підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень (**рис. 3.2**).

Порівняно з ефектом Hg^{2+} per se [F(1,22) = 24,32; p < 0,001; n = 12], останній дорівнював 0,416 ± 0,013 нмоль/мг протеїну, після комбінованого застосування cuCDs (1 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) та 0,453 ± 0,016 нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування cuCDs (10 мг/мл) та Hg^{2+} (5 мкМ) (у порівнянні з ефектом Hg^{2+} *per se* [$F_{(1,22)}$ = 10,54; p < 0,01; n = 12]). Була виявлена значна взаємодію між Hg^{2+} (5 мкМ) і cuCDs (10 мг/мл) [$F_{(1,44)}$ = 63,8; p < 0,001; n = 12] і між Hg^{2+} і cuCDs (1 мг/мл) [$F_{(1,44)}$ = 22,3; p < 0,001; n = 12].

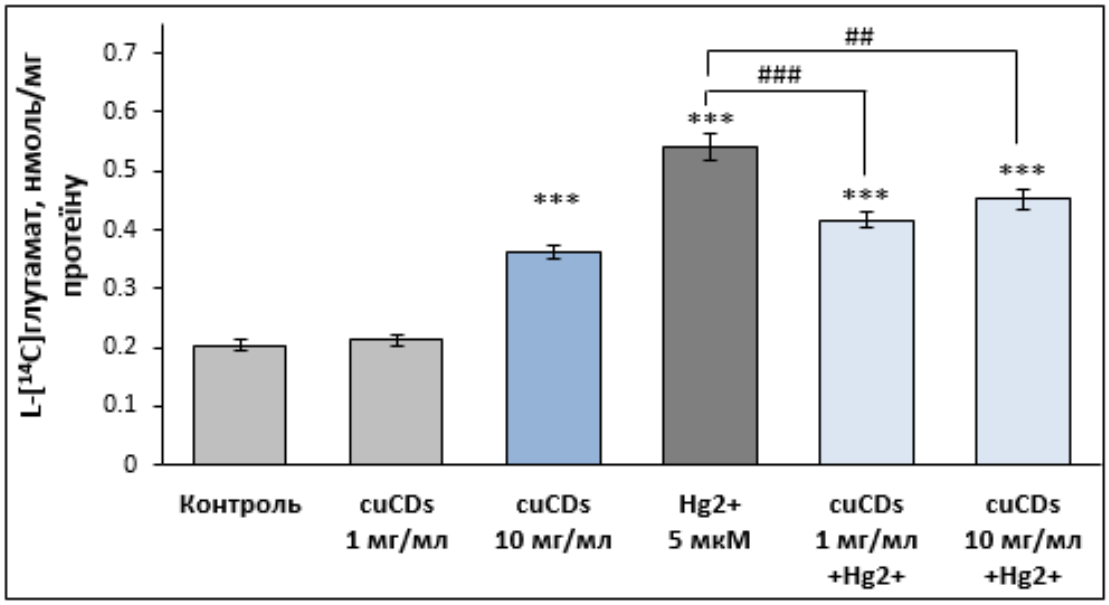


Рис. 3.2. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в нервових закінченнях у присутності cuCDs у концентраціях 1 і 10 мг/мл і Hg^{2+} (5 мкМ). Дані є середніми ± SEM. Дані аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу з наступним Tukey's post hoc тестом. ***, p < 0,001, порівняно з контролем; ##, p < 0,01; ###, p < 0,001 порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se*, n = 12.

Таким чином, ексайтотоксичне Hg^{2+}-індуковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень може бути пом’якшене за допомогою cuCDs.

У наступній серії експериментів оцінювали, чи здатні cuCDs послаблювати ексайтотоксичні ефекти, індуковані іншими важкими металами. Для перевірки специфічності пом'якшувальної дії cuCDs щодо Hg^{2+}-індукованого підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень цей показник також визначали за умов комбінованого впливу cuCDs та інших нейротоксичних важких металів, зокрема Cd^{2+}.

Раніше було показано, що Cd^{2+} у концентрації 100 мкМ послаблює початкову швидкість синаптосомального поглинання L-[^{14}C]глутамату на 27% [118]. У цьому дослідженні було показано, що Cd^{2+} у концентрації 300 мкМ підвищує позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препараті синаптосом, тоді як cuCDs не пом’якшують Cd^{2+}-індуковане підвищення цього рівня. Останній складав 0,194 ± 0,012 нмоль/мг протеїну у контролі; 0,265 ± 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 ± 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 виявив взаємодії між Cd^{2+} і cuCDs [$F_{(1,44)}$ = 0,08; p = 0,76; n = 12].

Таким чином, в препараті синаптосом опосередковане cuCDs пом'якшення Hg^{2+}-індукованого ефекту на рівень позаклітинного L-[^{14}C]глутамату було специфічним, оскільки не було виявлено жодних змін у Cd^{2+}-індукованій ексайтотоксичності.

Аналогічні дослідження були проведені із використанням іонів свинцю. Було показано, що Pb^{2+} у концентрації 2 мМ підвищує позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препараті синаптосом, тоді як cuCDs не пом’якшують Pb^{2+}-індуковане підвищення цього рівня. Останній складав 0,188 ± 0,010 нмоль/мг протеїну у контролі; 0,257 ± 0,019 нмоль/мг протеїну у присутності Pb^{2+} ($F_{(1,22)}$ = 11,38 p < 0,01; n = 12; порівняно з контролем) і 0,249 ± 0,013 нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування cuCDs (1 мг/мл) та Pb^{2+} (2 мМ) ($F_{(1,22)}$ = 0,13 p = 0,71; n = 12; порівняно з ефектом Pb^{2+} *per se*). Двофакторний

дисперсійний аналіз не виявив взаємодії між Pb^{2+} і cuCDs [$F_{(1,44)}$ = 0,20; p = 0,65; n = 12].

3.2.3. Вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату у присутності вуглецевих точок, синтезованих з β-аланіну (aCDs)

Проведено оцінку позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень за умов сумісної дії аланінових aCDs та Hg^{2+}. В препаратах нервових закінчень позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату дорівнював 0,581 ± 0,023 нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування aCDs (0,1 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) (порівняно з дією Hg^{2+} *per se* [$F_{(1,22)}$ = 0,04; p = 0,84; n = 12]) і 0,587 ± 0,025 нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування aCDs (0,2 мг/мл) і $HgCl_2$ (5 мкМ) (порівняно до впливу Hg^{2+} *per se* [$F_{(1,22)}$ = 0,15; p = 0,69; n = 12]) (**рис. 3.3**).

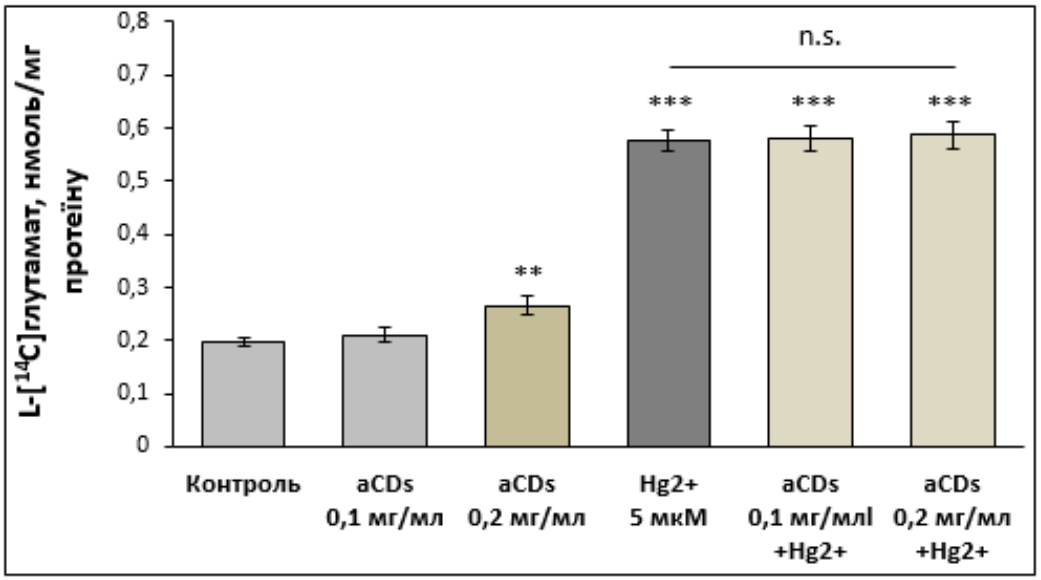


Рис. 3.3. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності aCDs у концентраціях 0,1 та 0,2 мг/мл і Hg^{2+} (5 мкМ). Дані є середніми ± SEM. Дані аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу з наступним Tukey's post hoc тестом. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, порівняно з контролем; n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se*, n = 12.

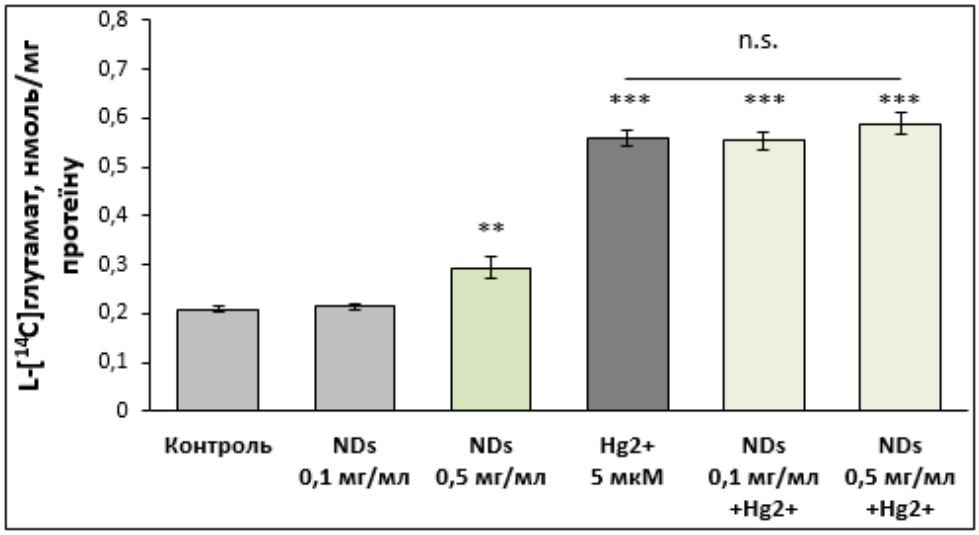
Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив взаємодії між Hg^{2+} і aCDs (0,1 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 0,07$; $p = 0,79$; n = 12] і між Hg^{2+} (5 мкМ) і aCDs (0,2 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 2,46$; $p = 0,12$; n = 12].

Отже, aCDs не впливали на ексайтотоксичне Hg^{2+}-індуковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень.

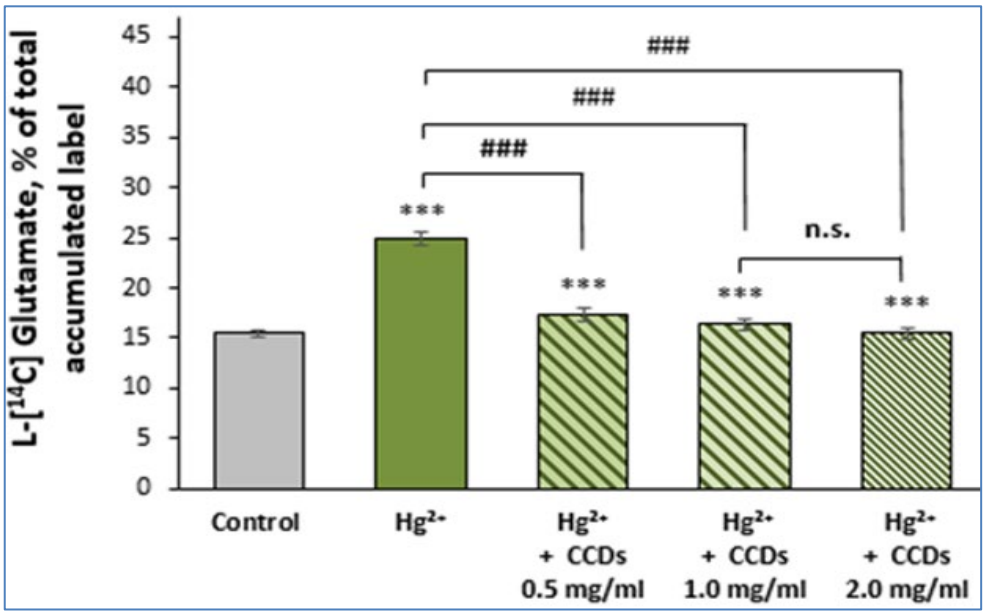
3.2.4. Вплив Hg^{2+} на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату у присутності синтезованих наноалмазів (NDs)

Наноалмази є компонентами твердих частинок атмосферного повітря та широко використовуються в екологічних технологіях, що зумовлює необхідність оцінки їх біосумісності та можливих нейромодулювальних властивостей [119]. Для проведення досліджень використовували наноалмази, одержані методом детонаційного синтезу в Інституті надтвердих матеріалів ім. В. М. Бакуля НАН України, характеристику яких наведено в попередніх дослідженнях [120-122].

У препаратах нервових закінчень при сумісному застосуванні наноалмазів і Hg^{2+} було проведено експерименти з моніторингу позасинаптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату. Показано, що позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень становив 0,553 ± 0,018 нмоль/мг протеїну після спільного застосування наноалмазів (NDs) (0,1 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) (порівняно з ефектом Hg^{2+}*per se* [$F_{(1,22)} = 0,07$; $p = 0,78$; $n = 12$]) і 0,588 ± 0,022 нмоль/мг протеїну після комбінованого застосування наноалмазів (0,5 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) (порівняно з ефектом Hg^{2+}*per se* [$F_{(1,22)} = 1,28$; $p = 0,26$; $n = 12$]) (**рис. 3.4 А**).



А



Б

Рис. 3.4. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень у присутності Hg^{2+} (5 мкМ) та (А) наноалмазів (NDs) в концентраціях 0,1 та 0,5 мг/мл та (Б) вуглецевих точок з відходів кавових зерен в концентраціях 0,5, 1,0 та 10 мг/мл. Дані є середніми ± SEM. Дані аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу з наступним Tukey's post hoc тестом. (А) - **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, порівняно з контролем; n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se*, n = 12. (Б) - ***, $p < 0,001$, порівняно з контролем; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$ порівняно з ефектом Hg^{2+}, n = 12.

Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив взаємодії між Hg^{2+} (5 мкМ) і наноалмазами (0,5 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 2,73$; $p = 0,10$; $n = 12$] і між Hg^{2+} і наноалмазами (0,1 мг/мл) [$F_{(1,44)} = 0,26$; $p = 0,60$; $n = 12$].

Таким чином, наноалмази не впливають на Hg^{2+}-опосередковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C] глутамату в препаратах нервових закінчень.

Встановлено, що Hg^{2+}, починаючи з концентрації 5 мкМ, викликає гостре концентраційно-залежне підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в нервових закінченнях. Дослідження комбінованої дії Hg^{2+} та вуглецевих точок, синтезованих із лимонної кислоти та сечовини, показало, що ці наночастинки здатні послаблювати Hg^{2+}-індуковане ексайтотоксичне підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату на 37 %.

Флуориметричний аналіз змін спектральних характеристик підтвердив утворення комплексу між вуглецевими точками та Hg^{2+}. На відміну від них, наноалмази не впливали на індуковане Hg^{2+} підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату. Запропонований експериментальний підхід може бути використаний для оцінки здатності різних частинок і сполук до зв'язування Hg^{2+} у біологічних системах. Таким чином, вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти та сечовини, послаблювали гостру нейротоксичну дію Hg^{2+} у нервових терміналях, що свідчить про їхню здатність модулювати нейротоксичні ефекти цього металу та підтверджує функціональну неоднорідність вуглецевих частинок як компонентів атмосферних аерозолів [114].

3.2.5 Вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату/[^{3}H]ГАМК в нервових закінченнях у присутності вуглецевих точок, синтезованих з зерен кави

Для оцінки впливу комбінованої дії вуглецевих точок, синтезованих із органічної сировини, а саме зерен кави (cofCDs), та Hg^{2+} на транспорт нейромедіаторів визначали позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК і L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень.

Як показано в **таблиці 3.4**, у присутності cofCDs у концентрації 0,01 мг/мл позаклітинні рівні L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК в препаратах нервових закінчень не змінювалися.

Таблиця 3.4

Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК в препаратах нервових закінчень після застосування cofCDs

	Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у препаратах нервових закінчень (% від загальної кількості накопиченої мітки)	F; p-значення	Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових закінчень (% від загальної кількості накопиченої мітки)	F; p-значення
Контроль	21,96 ± 0,53		18,06 ± 0,43	
cofCDs, 0,01 мг/мл	20,94 ± 0,44	$F_{(1,22)}$ = 2,36; p = 0,13; n.s.	18,85 ± 0,19	$F_{(1,22)}$ = 3,03; p = 0,09; n.s.

Дані аналізували за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу one-way ANOVA. Дані є середніми значеннями ± SEM., n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з контролем; n = 12.

В наступних експериментах в препаратах нервових закінчень при сумісному застосуванні cofCDs (0,01 мг/мл) та Hg^{2+} (5 мкМ) було проведено оцінку позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК. Позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату у порівнянні з контролем складав 0,204 ± 0,008 нмоль/мг протеїну у контролі; 0,561 ± 0,016 нмоль/мг протеїну у присутності Hg^{2+} (5 мкМ) ($F_{(1,22)}$ = 439,17 p < 0,001; n = 12.

Показано, що порівняно з ефектом Hg^{2+} *per se* позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень після спільного застосування cofCDs (0,01 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) становив 0,549 ± 0,017 нмоль/мг протеїну ($F_{(1,22)}$ = 0,26; p = 0,61; n = 12. Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив взаємодії між Hg^{2+} і cofCDs (0,01 мг/мл) [$F_{(1,44)}$ = 0,71; p = 0,40; n = 12].

Таким чином, на Hg^{2+}-опосередковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень cofCDs не впливали.

За аналогічною схемою визначали позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових закінчень. Показано, що у контролі позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК складав 121,76 ± 2,4 пмоль/мг протеїну; а порівняно з контролем за присутності Hg^{2+} (5 мкМ) підвищувався до 191,95 ± 3,59 пмоль/мг протеїну ($F_{(1,22)}$ = 287,36 p < 0,001; n = 12.

Позаклітинний рівень [^{3}H]ГАМК після спільного застосування cofCDs (0,01 мг/мл) і Hg^{2+} (5 мкМ) порівняно з ефектом Hg^{2+}*per se* становив 186,03 ± 4,42 пмоль/мг протеїну ($F_{(1,22)}$ = 1,17; p = 0,28 n = 12. Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив взаємодії між Hg^{2+} і cofCDs (0,01 мг/мл) [$F_{(1,44)}$ = 2,12; p = 0,15; n = 12].

Тобто, що у концентрації 0,01 мг/мл cofCDs не змінювали позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату і [^{3}H]ГАМК у препаратах нервових закінчень. Крім того, за цієї концентрації cofCDs не впливали на Hg^{2+} -індуковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК [123, 124].

Підвищення концентрації вуглецевих точок cofCDs до 0,5, 1 та 10 мг/мл призвело до статистично значущого помягшення ексайтотоксичного Hg^{2+}-індукованого підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень **(рис. 3.4 Б).** Таким чином, cofCDs у концентрації 0,5 - 10 мг/мл знижували Hg^{2+}-опосередковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату у препаратах нервових закінчень.

3.3. Аналіз комбінованого впливу PM диму з суміші деревини і ртуті на транспортер опосередковане накопичення/вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових терміналях та на мембранний потенціал нервових терміналей та закислення синаптичних везикул

3.3.1 Комбінований вплив PM диму від згоряння суміші деревини і ртуті на транспортер опосередковане накопичення/вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових терміналях

Дослідження комбінованого впливу кількох забруднювачів є перспективним напрямом для оцінки якості навколишнього середовища та потенційних ризиків для здоров'я людини. Водночас аналіз доступної літератури свідчить про відсутність даних щодо нейротоксичності, зумовленої спільною дією ртуті та вуглецевих аерозольних частинок, що підкреслює актуальність таких досліджень.

Оскільки ртуть є одним із поширених компонентів забруднення атмосферного повітря, води та ґрунту, її взаємодія з вуглецевмісними аерозольними частинками є цілком імовірною. Показано, що після зв'язування з вуглецем ртуть у навколишньому середовищі переходить із короткоживучих до довгоживучих пулів вуглецю, що сприяє її тривалішому збереженню та транспортуванню. З огляду на це можна припустити, що поєднаний вплив ртуті та вуглецевих аерозольних частинок здатний посилювати їхню нейротоксичну дію.

Наступним етапом дослідження став аналіз комбінованого впливу препарату твердих частинок аерозолю диму, отриманого з суміші деревини (WPs), та Hg^{2+} на транспортер-опосередковане накопичення і нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК із нервових терміналей.

Для цього інкубували синаптосоми протягом 10 хв. при 37°С за присутності:

1. препарату твердих частинок аерозолю диму WPs у концентрації 70 мкг/мл;
2. ртуті ($HgCl_2$) у концентрації 10 мкМ;
3. суміші WPs (70 мкг/мл) та $HgCl_2$ (10 мкМ), та вимірювали накопичення [^{3}H]глутамату або [^{3}H]ГАМК.

Нестимульоване вивільнення нейромедіаторів визначали після попереднього навантаження синаптосом L-[^{14}C]глутаматом або [^{3}H]ГАМК, видалення неакумульованої радіоактивної мітки та подальшої преінкубації відповідно до описаної вище схеми. Результати дослідження комбінованої дії WPs і Hg^{2+} на накопичення нейромедіаторів аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA), використовуючи WPs і Hg^{2+} як незалежні фактори, з подальшим проведенням множинного порівняння за критерієм Tukey (Tukey's post hoc test). Для порівняння окремих експериментальних груп також застосовували one-way ANOVA.

Накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами протягом 10 хв. складало у контролі 9,96 ± 0,36 нмоль / мг протеїну; за присутності Hg^{2+} до 6,46 ± 0,37 нмоль / мг протеїну [$F_{(1,16)}$ = 51,15; $p < 0,001$; n = 9], а за присутності WPs знижувалось до 6,83 ± 0,52 нмоль / мг протеїну [$F_{(1,16)}$ = 27,73; $p < 0,001$; n = 9] (**рис. 3.5 А**). У порівнянні з контролем при додаванні суміші WPs та Hg^{2+} до середовища інкубації також спостерігалось зменшення накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами, яке складало 6,59 ± 0,32 нмоль / мг протеїну [$F_{(1,16)}$ = 54,83; $p < 0,001$, n = 9] (**рис. 3.5**).

Однак, статистичний аналіз не показав достовірної різниці між накопиченням L-[^{14}C]глутамату під впливом суміші WPs та Hg^{2+} у порівнянні з впливом кожного з компонентів окремо: Hg^{2+} [$F_{(1,16)}$ = 0,07; p = 0,79] чи WPs [$F_{(1,16)}$ = 0,18; p = 0,67]. Two-way ANOVA виявив взаємодію між WPs та ртуттю [$F_{(1,32)}$ = 18,6; $p < 0,001$, n = 9].

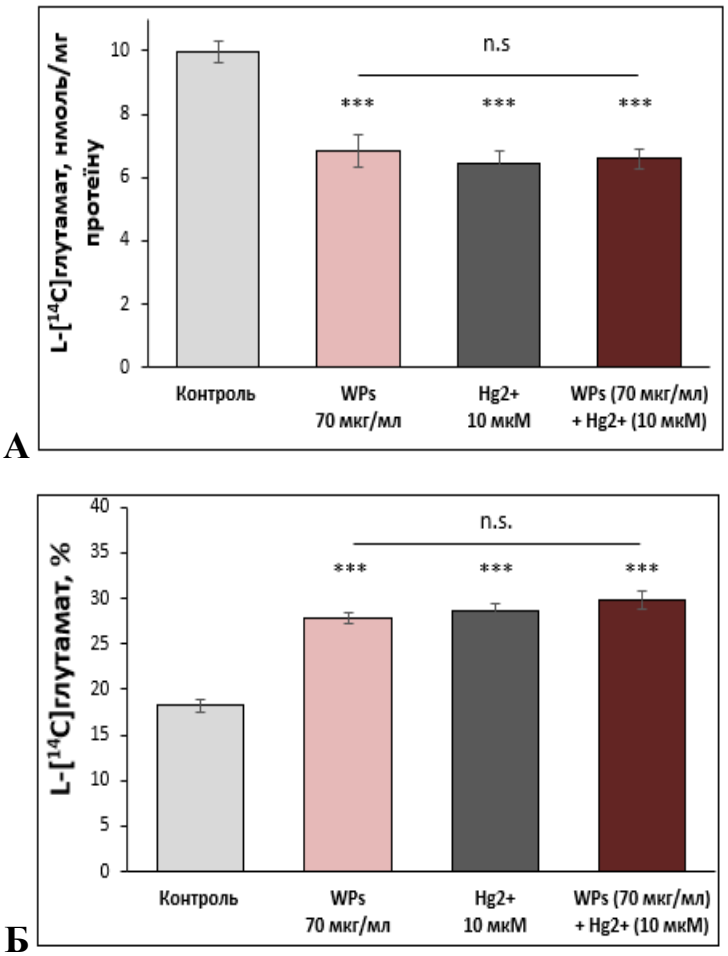


Рис. 3.5. Накопичення (**А**) та нестимульоване вивільнення (**Б**) L-[^{14}C]глутамату за комбінованого впливу препарату твердих частинок аерозолю WPs у концентрації 70 мкг/мл та ртуті (Hg^{2+}) у концентрації 10 мкМ з нервових закінчень. Дані представлені як середнє ± SEM ***, $p < 0,001$ відносно відповідного контролю, n.s., немає достовірних відмінностей порівняно з ефектом суміші WPs та Hg^{2+}; $n = 9$.

Нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату у препараті синаптосом підвищувалося під впливом частинок диму від згоряння деревини, як показано на **рис. 3.5 Б**,. Так, в контролі нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату від загальної кількості накопиченої мітки складало 18,26 ± 0,67 %, за присутності суспензії WPs - 27,85 ± 0,56 % [$F_{(1,16)} = 136,99$; $p < 0,001$, $n = 9$]. Нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату за присутності Hg^{2+} також

підвищувалось і дорівнювало 28,53 ± 0,83 % [$F_{(1,16)}$ = 104,60; p < 0,001, n = 9]. Суміш WPs та Hg^{2+} також спричиняла зростання нестимульованого вивільнення L-[^{14}C]глутамату у порівнянні з контролем, яке складало 29,85 ± 0,94 % [$F_{(1,16)}$ =113,5; p < 0,001, n = 9] (**рис. 3.5 Б**).

Однак, статистично достовірної різниці між нестимульованим вивільненням L-[^{14}C]глутамату під впливом суміші WPs та Hg^{2+} у порівнянні з впливом кожного з компонентів окремо: Hg^{2+} [$F_{(1,16)}$ = 1,22; p = 0,28] чи WPs [$F_{(1,16)}$ = 3,76; p = 0,07] не було виявлено. Двофакторний дисперсійний аналізвиявив взаємодію між досліджуваними факторами: WPs та ртуттю [$F_{(1,32)}$ = 33,0; p < 0,001, n = 9].

Накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами за 5 хв. в контрольних експериментах складало 513,41 ± 11,02 пмоль / мг протеїну; за присутності WPs [$F_{(1,16)}$ = 116,53; p < 0,001; n = 9] знижувалось до 361,49 ± 10,08 пмоль / мг протеїну та за присутності Hg^{2+} [$F_{(1,16)}$ = 93,90; p < 0,001; n = 9] до 342,08 ± 15,18 пмоль / мг протеїну. У середовищі інкубації за присутності суміші Hg^{2+} та WPs у порівнянні з контролем також спостерігалось зменшення накопичення [^{3}H]ГАМК синаптосомами, яке складало 350,41 ± 17,11 пмоль / мг протеїну [$F_{(1,16)}$ = 72,87; p < 0,001, n = 9].

Подібно до результатів, отриманих у дослідах з L-[^{14}C]глутаматом, статистично достовірних відмінностей не було виявлено на накопичення [^{3}H]ГАМК під впливом суміші WPs та Hg^{2+} у порівнянні з впливом кожного з компонентів окремо: Hg^{2+} [$F_{(1,16)}$ = 0,15; p = 0,70] чи WPs [$F_{(1,16)}$ = 0,35; p = 0,56]. Двофакторний дисперсійний аналіз виявив взаємодію між досліджуваними факторами: WPs та ртуттю [$F_{(1,32)}$ = 38,9; p < 0,001, n = 9].

У препараті синаптосом нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК під впливом WPs також підвищувалося. У контролі нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК складало 20,34 ± 0,72 % від загальної кількості накопиченої синаптосомами радіоактивної мітки, в той час як за присутності суспензії WPs - 28,57 ± 0,77 % [$F_{(1,16)}$ = 69,0; p < 0,001, n = 9], а за присутності Hg^{2+}

нестимульоване вивільнення [^{3}H]ГАМК також підвищувалось і дорівнювало 29,12 ± 0,68 % [$F_{(1,16)}$ = 89,18; p < 0,001, n = 9]. Суміш Hg^{2+} та WPs у порівнянні з контролем також спричиняла зростання нестимульованого вивільнення [^{3}H]ГАМК, яке складало 30,13 ± 0,73 % [$F_{(1,16)}$ =104,1; p < 0,001, n = 9].

Однак, між нестимульованим вивільненням [^{3}H]ГАМК під впливом суміші WPs та Hg^2 у порівнянні з впливом кожного з компонентів окремо: WPs [$F_{(1,16)}$ = 2,44; p = 0,13] чи Hg^{2+} [$F_{(1,16)}$ = 1,16; p = 0,29] статистично достовірної різниці не було виявлено. Two-way ANOVA виявив взаємодію між досліджуваними факторами: Hg^{2+} та WPs [$F_{(1,32)}$ = 27,9; p < 0,001, n = 9].

3.3.2. Комбінований вплив зразків PM диму від згоряння суміші деревини WPs і ртуті на мембранний потенціал нервових терміналей та закислення синаптичних везикул

Зміни мембранного потенціалу нервових терміналей під впливом суспендованого у воді препарату твердих частинок диму від згоряння суміші деревини (WPs), Hg^{2+} та їх комбінованої дії оцінювали у нервових терміналях, попередньо врівноважених із флуоресцентним потенціал-чутливим барвником родаміном 6G. На **рис. 3.6 А** продемонстровано, що препарат PM диму від згоряння суміші деревини WPs (70 мкг/мл) та Hg^{2+}(10 мкМ) *per se* спричиняли деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом. Встановлено, що за умов комбінованої дії WPs та Hg^{2+} також відбувалася зміна мембранного потенціалу, проте ефект їх сумісного застосування не перевищував ефектів, спричинених WPs або Hg^{2+} *per se*.

Закислення синаптичних везикул у нервових терміналях за присутності препарату PM диму від згоряння суміші деревини WPs (70 мкг/мл), Hg^{2+}(10 мкМ), а також їх сумісної дії, визначали з використанням pH-чутливого зонду AO. На **рис. 3.6. Б** показано що за умов комбінованого застосування Hg^{2+} +

WPs, їх сумісна дія на закислення синаптичних везикул у нервових терміналях не відрізнялась від впливу кожного з компонентів поодинці.

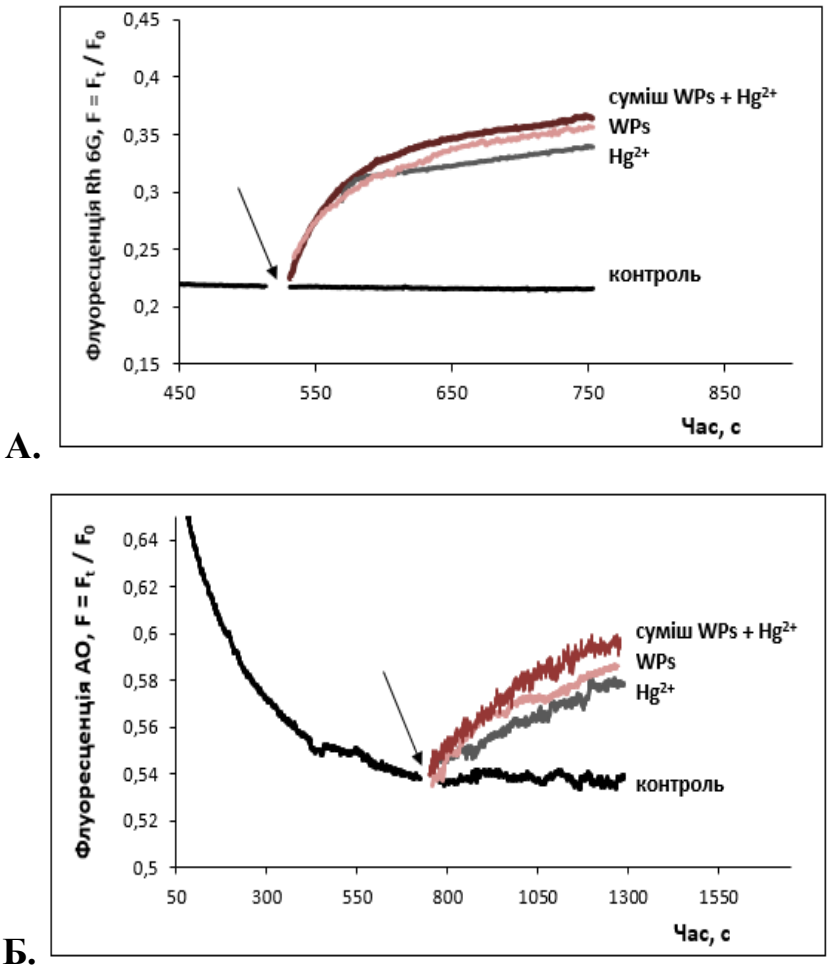


Рис. 3.6. Мембранний потенціал нервових закінчень (**А**) та закислення синаптичних везикул (**Б**) за присутності Hg^{2+} та WPs. Суспензії синаптосом були врівноважені потенційно чутливим барвником родаміном 6G (**А**) або акридиновим оранжевим (АО) (**Б**); при досягненні стабільного рівня флуоресценції барвника додавали стандартний фізіологічний розчин (контроль), Hg^{2+} (10 мкМ $HgCl_2$), WPs (70 мкг/мл) або вносили суміш $HgCl_2$ + WPs (суміш попередньо інкубували протягом 30 хв) (позначено стрілкою). Кожна крива є репрезентативною для 9 експериментальних даних.

Таким чином, тверді частинки аерозолю диму, отриманого з суміші деревини, WPs (70 мкг/мл), не впливали на Hg^{2+} (10 мкМ) – індуковані зміни накопичення та вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових

терміналях, мембранного потенціалу та закислення синаптичних везикул, що було показано за комбінованої дії препарату диму WPs та ртуті [125].

3.4. Функціоналізовані мезопористі наночастинки діоксиду кремнію: аналіз нейротоксичності та здатності знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+}

Мезопористі наночастинки діоксиду кремнію (MSN) є наноструктурованими матеріалами, які привернули значну увагу завдяки своїм унікальним властивостям і широким можливостям застосування в різних галузях. Ці наночастинки мають кремнеземний каркас із високоорганізованою мезопористою структурою. Серед різних типів неорганічних наночастинок MSN становлять особливий інтерес завдяки високій сорбційній здатності та дискретній природі, здатності утворювати колоїдні розчини або, за певних умов, проникати в клітини, а також гнучкості їхньої структури та властивостей.

MSN характеризуються низкою унікальних властивостей, зокрема великою регульованою питомою поверхнею та об'ємом пор, високою термічною й хімічною стабільністю, можливістю функціоналізації поверхні, а також різноманітністю розмірів і морфології частинок [126]. Ці характеристики роблять їх перспективними для багатьох застосувань, включаючи адресну доставку лікарських засобів, каталіз, біосенсори та екологічну ремедіацію.

3.4.1. Аналіз ризику гострої нейротоксичності MSN-SH та MSN-SO_3H у нервових закінченнях головного мозку щурів

Оцінку ризику гострої нейротоксичності MSN, функціоналізованих SH- та SO_3H- групами, а саме MSN-SH та MSN-SO_3H, синтезованих в Інституті фізичної хімії ім. Л.В.Писаржевського НАН України, проводили на препаратах нервових закінчень шляхом визначення їхнього впливу на позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату – основного збуджувального нейромедіатора центральної нервової системи. Зміна позасинаптосомального рівня L-[^{3}H]глутамату відображає можливу дезінтеграцію плазматичної мембрани нервових закінчень і порушення транспорту нейромедіаторів.

Було встановлено, що MSN-SH у діапазоні концентрацій 0,25-0,5 мг/мл (маса наночастинок, суспендованих у рідкому середовищі) не змінювали базальний рівень L-[^{3}H]глутамату в препаратах нервових закінчень. Підвищення концентрації MSN-SH до 1,0 мг/мл призводило до зростання базального рівня L-[^{3}H]глутамату в препаратах нервових закінчень (**Таб. 3.5**). Водночас MSN-SO_3H залишалися інертними щодо модулювання базального рівня L-[^{3}H]глутамату в препаратах нервових закінчень у діапазоні концентрацій 0,25-1,0 мг/мл (**Таб. 3.6**).

Таким чином, можна зробити висновок, що MSN-SH і MSN-SO_3H є біосумісними та не виявляють ознак гострої нейротоксичності за концентрацій, нижчих за 0,5 мг/мл (**Таб. 3.5, 3.6**).

Таб. 3.5.

Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату у контрольній групі та за присутності MSN-SH

Опис зразків	Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату (% від загальної накопиченої мітки)	F; P-значення
Контроль	15,92 ± 0,36	–
MSN-SH; 0,1 мг/мл	16,16 ± 0,40; н.з.	F(1,22) = 0,23; P = 0,64
MSN-SH; 0,5 мг/мл	16,86 ± 0,51; н.з.	F(1,22) = 2,53; P = 0,13
MSN-SH; 1,0 мг/мл	18,63 ± 0,27***	F(1,22) = 40,21; P < 0,001

Примітка. Дані наведено як середнє ± SEM. *** – P < 0,001; н.з. – статистично значущих відмінностей порівняно з контролем не виявлено; n = 12.

Таблиця 3.6.

Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату у контрольній групі та за присутності MSN-SO_3H

Опис зразків	Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату (% від загальної накопиченої мітки)	F; P-значення
Контроль	16,43 ± 0,38	–
MSN-SO_3H; 0,1 мг/мл	15,79 ± 0,61; н.з.	F(1,22) = 0,90; **P = 0,35**
MSN-SO_3H; 0,5 мг/мл	16,62 ± 0,42; н.з.	F(1,22) = 0,12; **P = 0,74**
MSN-SO_3H; 1,0 мг/мл	16,10 ± 0,48; н.з.	F(1,22) = 0,33; **P = 0,57**

Примітка. Дані наведено як середнє ± SEM. н.з. – статистично значущих відмінностей порівняно з контролем не виявлено; n = 12.

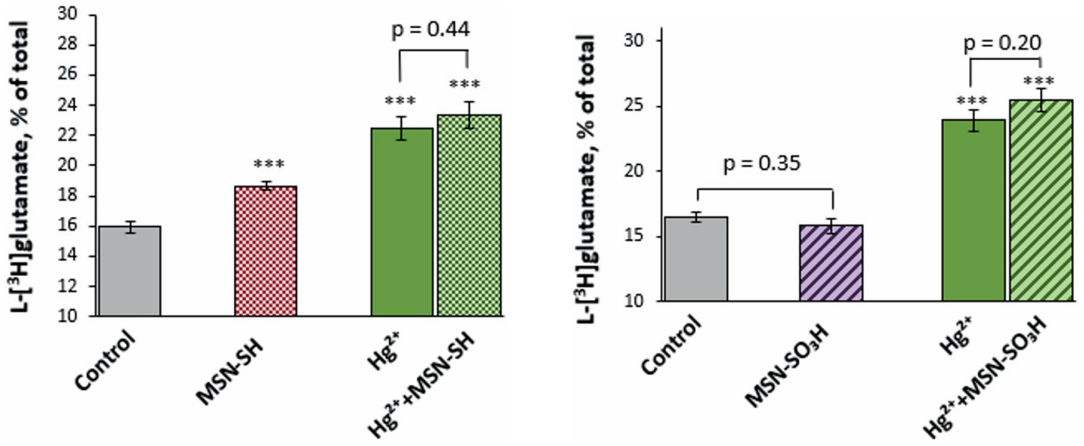
Таким чином, як MSN-SH, так і MSN-SO_3H не змінювали позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату при концентраціях, нижчих за 0,5 мг/мл. З огляду на цей факт можна припустити, що функціоналізовані мезопористі наночастинки діоксиду кремнію MSN-SH та MSN-SO_3H завдяки своїй біосумісності є універсальною платформою з великим потенціалом для застосування в різних галузях науки. Їхні унікальні структурні та функціональні властивості й надалі стимулюють розвиток матеріалознавства, нанотехнологій та суміжних наукових напрямів.

3.4.2. Визначення здатності MSN-SH та MSN-SO_3H знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} в нервових закінченнях головного мозку щурів

Метою цього дослідження було проаналізувати здатність MSN-SH та MSN-SO_3H адсорбувати Hg^{2+} у біологічній моделі з використанням ізольованих нервових закінчень кори головного мозку щурів (синаптосом). З використанням нещодавно розробленої нами моделі [114] було проаналізовано здатність MSN-SH та MSN-SO_3H послаблювати гостру нейротоксичність, індуковану ртуттю. Було показано, що ні MSN-SH, ні MSN-SO_3H не були здатні зменшувати шкідливий вплив іонів Hg^{2+} (10 мкМ $HgCl_2$) у нервових закінченнях головного мозку щурів (**рис. 3.7**).

Експериментальні дані аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) з подальшим застосуванням post hoc тесту Тьюкі. Було встановлено, що статистично значуща взаємодія між Hg^{2+} і MSN-SH [$F(1,44) = 2,47$; $P = 0,12$; $n = 12$] була відсутня.

Двофакторний дисперсійний аналіз (two-way ANOVA) також не виявив статистично значущої взаємодії між Hg^{2+} та MSN-SO_3H [$F(1,44) = 2,63$; $P = 0,11$; $n = 12$].



А **Б**

Рис. 3.7. Вплив MSN-SH (А) та MSN-SO_3H (Б) у концентрації 1,0 мг/мл на індуковане іонами Hg^{2+} підвищення базального рівня L-[³H]глутамату.

Примітка. Використовували Hg^{2+} (10 мкМ $HgCl_2$). Дані наведено як середнє ± SEM. *** – $P < 0,001$ порівняно – з контролем; n = 12.

Обидва типи наночастинок, MSN-SH та MSN-SO_3H, не виявляли ознак гострої нейротоксичності та характеризувалися високою біосумісністю. MSN-SH і MSN-SO_3H не послаблювали гостру нейротоксичність, індуковану іонами Hg^{2+}, у нервових закінченнях і, відповідно, не адсорбували ці метали в біологічних системах. Таким чином, MSN-SH і MSN-SO_3H можуть бути перспективними безпечними адсорбентами/носіями речовин, відмінних від важких металів, для застосування в біотехнології та медицині.

З екологічної точки зору зроблено висновок, що мезопористі наночастинки діоксиду кремнію (навіть функціоналізовані) є безпечними та не зв'язують важкі метали, а отже, не можуть слугувати їхніми переносниками в організм під час пилових бур [127].

3.4.3. Визначення біосумісності MSN з закріпленими аміногрупами MSN-NH_2 та їх здатності знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} в нервових закінченнях головного мозку щурів

В наступній серії експериментів досліджували мезопористі кремнеземні наночастинки MSN з закріпленими аміногрупами (MSN-NH2), синтезовані в Інституті фізичної хімії ім. Л.В.Писаржевського НАН України, щодо їх біосумісності та здатності знижувати нейротоксичну дію Hg^{2+} в нервових закінченнях головного мозку щурів.

Як показано в **таблиці 3.7**, MSN-NH_2 не змінювали позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату у синаптосомах у діапазоні концентрацій 0,1-1,0 мг/мл. Отже, MSN-NH_2 не мали ексайтотоксичних ознак та були біосумісними.

Таблиця 3.7.

Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату у контрольній групі та за присутності MSN-NH_2

Опис зразків	Позасинаптосомальний рівень L-[^{3}H]глутамату (% від загальної накопиченої мітки)	F; P-значення
Контроль	14,30 ± 0,17	–
MSN-NH_2; 0,1 мг/мл	14,35 ± 0,21	F(1,16) = 0,03; p = 0,86; н.з.
MSN-NH_2; 0,5 мг/мл	14,18 ± 0,25	F(1,16) = 0,18; p = 0,67; н.з.
MSN-NH_2; 1,0 мг/мл	13,96 ± 0,23	F(1,16) = 1,64; p = 0,22; н.з.

Примітка. Дані наведено як середнє ± SEM. н.з. – статистично значущих відмінностей порівняно з контролем не виявлено; n = 9.

Таким чином, показано, що MSN-NH_2 не впливали на позасинаптосомальний рівень L-[^{14}C]глутамату і, отже, не викликали ексайтотоксичності.

Мембранний потенціал нервових закінчень є рушійною силою поглинання та вивільнення глутамату, опосередкованого транспортерами, і також відтворює цілісність мембрани. Синаптосомальний мембранний потенціал контролювали за допомогою потенціометричного флуоресцентного барвника родаміну 6G. Стандартний фізіологічний розчин, доданий до синаптосомальної інкубації, розглядали як контроль. Як показано на **рис. 3.8**, застосування MSN-NH_2 у концентрації 1,0 мг/мл викликало деполяризацію мембрани.

Слід зазначити, що додаткові експерименти без синаптосом були проведені для моніторингу можливих змін флуоресценції родаміну 6G у присутності MSN-NH_2. У цих експериментах не було виявлено змін флуоресценції барвника, і не було виявлено неспецифічної взаємодії родаміну 6G та MSN-NH_2 без синаптосом.

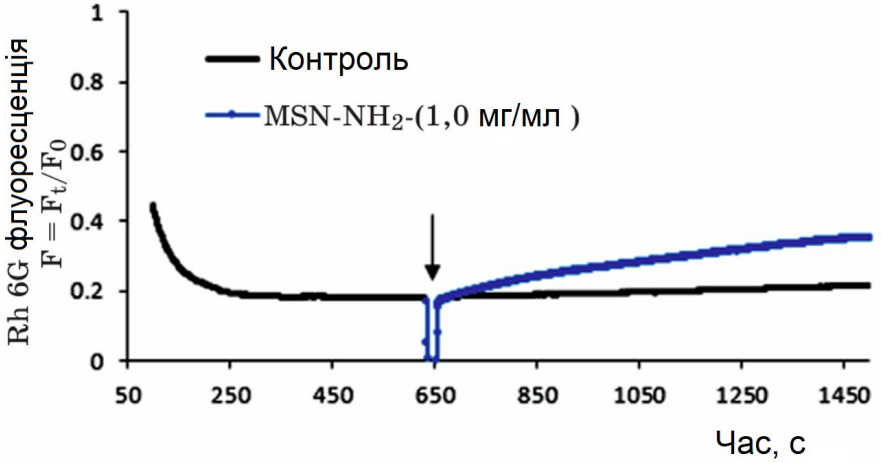


Рис. 3.8. Мембранний потенціал нервових закінчень у присутності MSN-NH_2 у концентрації 1,0 мг/мл. Синаптосоми врівноважували 0,5 мкМ родаміном 6G, і коли досягався стабільний рівень флуоресценції барвника, до синаптосом додавали стандартний фізіологічний буфер або MSN-NH_2 (стрілка). Крива є репрезентативною для 6 експериментальних записів даних, виконаних з різними препаратами синаптосом.

Як показано на **рис. 3.9**, MSN-NH_2 у концентрації 1,0 мг/мл не змінював екситотоксичне збільшення синаптосомального позаклітинного рівня L-[^{14}C] глутамату, індуковане Hg^{2+}.

Таким чином, MSN-NH_2 були інертними щодо пом'якшення або посилення екситотоксичних ефектів, індукованих Hg^{2+}, у нервових закінченнях.

Двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) не виявив взаємодії між Hg^{2+} та MSN-NH_2 [$F(1,32) = 0,64$; $p = 0,43$; $n = 9$] в експериментах з L-[14C] глутаматом.

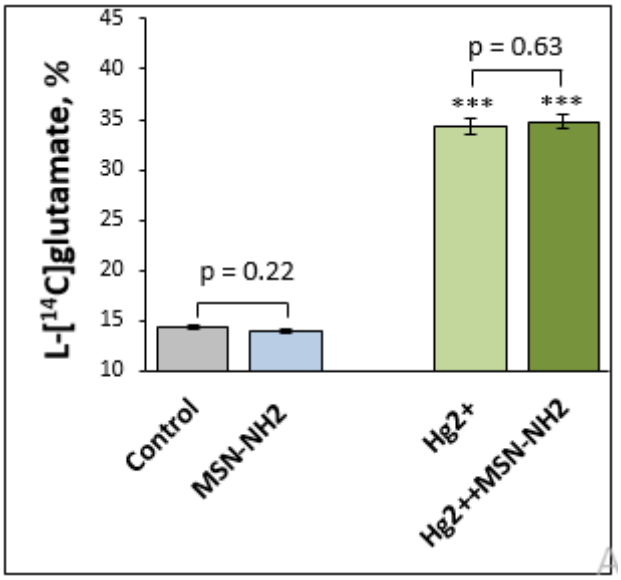


Рис. 3.9. MSN-NH_2 (1,0 мг/мл) не модулював екситотоксичне підвищення позаклітинного синаптосомального рівня L-[^{14}C] глутамату, індуковане Hg^{2+}. Дані представлені як середнє значення ± SEM. ***, $p < 0{,}001$; порівняно з контролем; $n = 9$.

Таким чином, MSN-NH_2 не демонстрували ексайтотоксичних ознак, і, тому, були біосумісними, але не пом’якшували ексайтотоксичні ефекти ртуті і не адсорбували цей метал в біологічній системі.

РОЗДІЛ IV. ЗАКЛЮЧНА ЧАСТИНА.

Показано, що Hg^{2+} суттєво впливала на транспортування збуджуючого нейротрансмітера L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях головного мозку щурів, зокрема знижувала початкову швидкість і акумуляцію L-[^{14}C]глутамату, починаючи з концентрації 10 мкМ. Значне зниження накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами призводило до ексайтотоксичного підвищення його позаклітинного рівня у присутності Hg^{2+}, причому тонічне вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом за присутності інгібітора транспортера глутамату DL-трео-β-бензилоксіаспартату, і, отже, цілісність плазматичної мембрани та її проникність не змінювалась для молекул глутамату. Отже, підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату, індуковане Hg^{2+}, було результатом Hg^{2+}-опосередкованого послаблення функціонування транспортерів глутамату, але не наслідком Hg^{2+}-індукованого підвищення тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових закінчень.

Розроблений підхід та чітко визначені синаптичні показники були застосовані для моніторингу здатності різних частинок/сполук мати ознаки адсорбування/детоксикації Hg^{2+} в біологічних системах. Класичні молекулярні агенти, а саме DTT і EGTA, знизили вплив Hg^{2+} на позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень, і таким чином адекватність підходу моніторингу була перевірена.

З використанням розробленого підходу показано, що вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти/сечовини є біосумісними за концентрації 1 мг/мл та здатні пом'якшували ексайтотоксичне Hg^{2+}-індуковане підвищення позасинаптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату на 37%. Натомість вуглецеві точки, синтезовані з β-аланіну, та наноалмази не впливали на цей показник. Також, вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти/сечовини, можуть використовуватися як безпечний адсорбент/детоксикант ртуті в організмі людини. Показано, що вуглецеві точки, синтезовані з зерен кави, не змінюють

позаклітинні рівні L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК у нервових закінченнях у концентрації 0,01 мг/мл, демонструючи біосумісність. Ці наночастинки у концентрації 0,01 мг/мл не впливали на Hg^{2+}-опосередковане підвищення позасинптосомального рівня L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК. У концентрації 0,5 - 10 мг/мл вуглецеві точки, синтезовані з зерен кави, знижують позаклітинний рівень L-[^{14}C]глутамату нервових закінченнях.

Показано, що нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату з синаптосом підвищувалося під впливом препарату твердих частинок диму, отриманого з суміші деревини. Доведено, що препарат твердих частинок диму від згоряння суміші деревини (70 мкг/мл) та Hg^{2+}(10 мкМ) per se спричиняли деполяризацію плазматичної мембрани синаптосом. Було визначено, що за умов сумісної дії частинок диму та Hg^{2+} мембранний потенціал та ацидифікація синаптичних везикул також змінювалися, але ефект суміші не перевищував впливу частинок та Hg^{2+} поодинці. Таким чином, комбінована дія твердих частинок диму та Hg^{2+} призводила до шкідливого «мультизабруднювального» ефекту на накопичення та нестимульоване вивільнення L-[^{14}C]глутамату та [^{3}H]ГАМК з нервових терміналей, зміну мембранного потенціалу та ацидифікацію синаптичних везикул.

Мезопористі наночастинки кремнезему, функціоналізовані групами -SH та -SO_3H та із закріпленими аміногрупами не продемонстрували ознаки гострої нейротоксичності, тобто виявили високу біосумісність. Наночастинки не пом'якшували гостру нейротоксичність, індуковану Hg^{2+}, в нервових закінченнях, і тому не адсорбували цей метал в біологічній системі. Отже, наночастинки мають перспективи для використання як адсорбенти/носії інших речовин, окрім важких металів, у медицині та біотехнології.

Було запропоновано новий експериментальний підхід до оцінки нейротоксичності важких металів та адсорбувальних/детоксикаційних властивостей різних сполук та наноматеріалів із використанням агрегометрії. Отримані результати підтвердили, що цей адекватний синапичний показник

може бути у подальшому використаний як для швидкої оцінки впливу різних важких металів на нервові закінчення головного мозку, так і для оцінки адсорбувальних/детоксикаційних властивостей різних сполук або наночастинок - потенційних хелаторів. Метод розроблений поза межами дисертаційних завдань та знаходиться у процесі розробки та верифікації з перспективою патентування.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволили встановити молекулярні механізми гострої нейротоксичної дії Hg^{2+} у нервових терміналях головного мозку щурів та оцінити перспективність різних наноматеріалів як потенційних адсорбентів/детоксикантів цього металу в біологічних системах. Отримані результати розширюють сучасні уявлення про механізми комбінованої нейротоксичності важких металів і твердих частинок, забруднювачів повітря, а також обґрунтовують використання ізольованих нервових терміналей як високочутливої тест-системи для скринінгу біосумісності наноматеріалів та оцінки їхньої здатності до адсорбування/детоксикації токсичних металів. У роботі визначені перспективні наноматеріали для створення безпечних ентеросорбентів і біотехнологічних засобів детоксикації ртуті, а також у формуванні експериментальної основи для оцінки ризиків комбінованого впливу екологічних забруднювачів на нервову систему.

1. Встановлено суттєвий вплив Hg^{2+} на транспортування збуджуючого нейротрансмітера L-[^{14}C]глутамату у нервових терміналях головного мозку щурів: підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату, індуковане Hg^{2+}, є результатом Hg^{2+}-опосередкованого послаблення функціонування транспортерів глутамату, але не наслідком Hg^{2+}-індукованого підвищення тонічного вивільнення L-[^{14}C]глутамату з нервових закінчень.

2. Встановлено, що вуглецеві точки, синтезовані з лимонної кислоти та сечовини, зв'язують Hg^{2+} і послаблюють його ексайтотоксичну дію в нервових терміналях, тоді як наноалмази не виявляють адсорбувальних/детоксикаційних властивостей. Запропоновано експериментальний підхід для оцінки здатності наноматеріалів до зв'язування Hg^{2+} у біологічних системах.

3. Продемонстровано, що вуглецеві точки, синтезовані із зерен кави, у концентрації 0,5-10 мг/мл знижували Hg^{2+}-індуковане підвищення позаклітинного рівня L-[^{14}C]глутамату в препаратах нервових закінчень.

4. Виявлено, що тверді частинки аерозолю диму, отриманого з суміші деревини, не модифікували Hg^{2+}, а також не впливали на зміни мембранного потенціалу та закислення синаптичних везикул за умов їх комбінованої дії з Hg^{2+}.

5. Показано, що функціоналізовані мезопористі наночастинки діоксиду кремнію (MSN-SH і MSN-SO_3H) характеризуються високою біосумісністю, не виявляють ознак гострої нейротоксичності та не адсорбують Hg^{2+} у біологічній системі. Це свідчить про перспективність їх використання як безпечних наноплатформ для доставки біологічно активних речовин, але не як засобів детоксикації важких металів.

6. Визначено, шо мезопористі кремнеземні наночастинки із закріпленими аміногрупами не впливали на позасинаптосомний рівень L-[^{14}C]глутамату і, отже, не викликали ексайтотоксичності. У флуоресцентних дослідженнях частинки деполяризували мембрану. Наночастинки не пом’якшували ексайтотоксичні ефекти Hg^{2+} і не адсорбували цей метал в біологічній системі. Це свідчить про перспективність їх використання в біотехнології, не пов’язаної з детоксикацією важких металів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World Health Organization. 10 chemicals of public health concern. Geneva: WHO, 2020.

2. Cristaldi A., Fiore M., Oliveri Conti G., et al. Possible association between PM2.5 and neurodegenerative diseases: A systematic review. Environ Res. 2022 May 15;208:112581. doi: 10.1016/j.envres.2021.112581. Epub 2021 Dec 31. PMID: 34979121.

3. Tan L., Nakanishi E., Lee M. Association between exposure to air pollution and late-life neurodegenerative disorders: An umbrella review, Environment International, Volume 158, 2022, 106956, ISSN 0160-4120, https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106956.

4. Leal Filho W., Eustachio JHPP, Fedoruk M., et al. War in Ukraine: an overview of environmental impacts and consequences for human health. Front. Sustain. Resour. Manag. 3:1423444, 2024. doi: 10.3389/fsrma.2024.1423444.

5. Matei E., Râpă M., Mateș IM., et al. Heavy Metals in Particulate Matter-Trends and Impacts on Environment. Molecules. 2025 Mar 25;30(7):1455. doi: 10.3390/molecules30071455. PMID: 40286077; PMCID: PMC11990512.

6. Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., et al. Heavy metal toxicity and the environment. Exp Suppl. 2012;101:133-64. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6. PMID: 22945569; PMCID: PMC4144270.

7. He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J Trace Elem Med Biol. 2005;19(2-3):125-40. doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.010. Epub 2005 Oct 24. PMID: 16325528.

8. Luo L. Architectures of neuronal circuits. Science. 2021 Sep 3;373(6559):eabg7285. doi: 10.1126/science.abg7285. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34516844; PMCID: PMC8916593.

9. Sadeh, S., Clopath, C. Inhibitory stabilization and cortical computation. Nat Rev Neurosci 22, 21–37 (2021). https://doi.org/10.1038/s41583-020-00390-z

10. Allen N.J., Lyons D.A. Glia as architects of central nervous system formation and function. Science. 2018;362:181–185. DOI: 10.1126/science.aat0473.

11. Zeng, H., Sanes, J. Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. Nat Rev Neurosci 18, 530–546 (2017). https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85

12. C. Magee J., Grienberger C. 2020. Synaptic Plasticity Forms and Functions. Annual Review of Neuroscience 43:95-117. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842

13. Bargmann, C., Marder, E. From the connectome to brain function. Nat Methods 10, 483–490 (2013). https://doi.org/10.1038/nmeth.2451

14. Beaulieu J, Gainetdinov R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Pharmacological Reviews, 63, 182-217

15. Koob G., Volkow N. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. The Lancet Psychiatry, 3, 760-773

16. Nestler, E.J. Hyman, S.E. Malenka, R.J. Molecular Neuropharmacology: Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw Hill, New York, 2001

17. Hyman S.E. Neurotransmitters. Curr Biol. 2005 Mar 8;15(5):R154-8. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.037. PMID: 15753022.

18. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. Front. Pharmacol. (2017) 8:661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661.

19. Illes P., Müller C.E., Jacobson K.A., et al. Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. Br J Pharmacol. 2021; 178: 489–514. https://doi.org/10.1111/bph.15299

20. Jacobson K.A., Delicado E.G., Gachet C., et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. Br J Pharmacol. 2020; 177: 2413–2433. https://doi.org/10.1111/bph.15005

21. Kandel E.R., Koester J.D., Mack S.H., et al. Principles of Neural Science. Sixth edition., McGraw Hill, 2021, ISBN: 978-1-25-964224-1.

22. Bean B. The action potential in mammalian central neurons. Nat Rev Neurosci 8, 451–465 (2007). https://doi.org/10.1038/nrn2148

23. Catterall W.A. Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. Neurochem Res 42, 2495–2504 (2017). https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9

24. Hilger D., Masureel M., Kobilka B.K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. Nat Struct Mol Biol 25, 4–12 (2018). https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7

25. Rock J.D., Moir J.W.B; Microaerobic denitrification in Neisseria meningitidis. Biochem Soc Trans 1 February 2005; 33 (1): 134–136. doi: https://doi.org/10.1042/BST0330134

26. Caroni P., Donato F., Muller D. Structural plasticity upon learning: regulation and functions. Nat Rev Neurosci 13, 478–490 (2012). https://doi.org/10.1038/nrn3258

27. Nusbaum M., Blitz D., Marder E. Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission. Nat Rev Neurosci 18, 389–403 (2017). https://doi.org/10.1038/nrn.2017.56

28. Traynelis S., Wollmuth L., McBain C., et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacological Reviews, 62, 405-496

29. Abbracchio M.P., Burnstock G., Verkhratsky A., et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci. 2009 Jan;32(1):19-29. doi: 10.1016/j.tins.2008.10.001. Epub 2008 Nov 12. PMID: 19008000.

30. Südhof T.C. The cell biology of synapse formation. J Cell Biol. 2021 Jul 5;220(7):e202103052. doi: 10.1083/jcb.202103052. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34086051; PMCID: PMC8186004.

31. Vaaga C.E., Borisovska M., Westbrook G.L. Dual-transmitter neurons: functional implications of co-release and co-transmission. Curr Opin Neurobiol. 2014 Dec;29:25-32. doi: 10.1016/j.conb.2014.04.010. Epub 2014 May 13. PMID: 24816154; PMCID: PMC4231002.

32. Tritsch N., Granger, A., Sabatini B. Mechanisms and functions of GABA co-release. Nat Rev Neurosci 17, 139–145 (2016). https://doi.org/10.1038/nrn.2015.21

33. Svensson E., Apergis-Schoute J., Burnstock G., et al. General Principles of Neuronal Co-transmission: Insights From Multiple Model Systems. Front Neural Circuits. 2019 Jan 21;12:117. doi: 10.3389/fncir.2018.00117. PMID: 30728768; PMCID: PMC6352749.

34. Garthwaite J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. J Physiol. 2016 Jan 1;594(1):9-18. doi: 10.1113/JP270297. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26486504; PMCID: PMC4704503.

35. Wolosker H., Balu D.T., Coyle J.T. The Rise and Fall of the d-Serine-Mediated Gliotransmission Hypothesis. Trends Neurosci. 2016 Nov;39(11):712-721. doi: 10.1016/j.tins.2016.09.007. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27742076; PMCID: PMC5113294.

36. Wu T., Zhang Y., Han J. Targeting the nervous system: Mechanistic insights into neuro–tumor communication and therapeutic opportunities, Acta Pharmaceutica Sinica B, 2026, ISSN 2211-3835, https://doi.org/10.1016/j.apsb.2026.07.011.

37. Knopman D.S., Amieva H., Petersen R.C., et al. Alzheimer disease. Nat Rev Dis Primers 7, 33 (2021). https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y

38. Hampel H., Hardy J., Blennow K., et al. The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. Mol Psychiatry. 2021 Oct;26(10):5481-5503. doi: 10.1038/s41380-021-01249-0. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34456336; PMCID: PMC8758495.

39. Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Curr Neuropharmacol. 2016;14(1):101-15. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726. PMID: 26813123; PMCID: PMC4787279.

40. Livingston G., Huntley J., Sommerlad A., et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. Lancet. 2020 Aug 8;396(10248):413-446. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6. Epub 2020 Jul 30. Erratum in: Lancet. 2023 Sep 30;402(10408):1132. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02043-3. PMID: 32738937; PMCID: PMC7392084.

41. World Health Organization. Dementia. Fact sheet. Updated March 2025.

42. Scheltens P., De Strooper B., Kivipelto M., et al. Alzheimer's disease. Lancet. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33667416; PMCID: PMC8354300.

43. Petersa R., Eeb N., Peters J., et al. Air Pollution and Dementia: A Systematic Review. Journal of Alzheimer’s Disease, Volume 70, Issue s1, 2019, Pages S145-S163, https://doi.org/10.3233/JAD-180631

44. Grandjean P., Landrigan P. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. The Lancet Neurology, 13, 330-338

45. Aschner M., Costa, L.G. Environmental Factors in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2015 – 2015. ISBN: 9780128002285

46. Landrigan P., Fuller R., Acosta N., et al. The Lancet Commission on pollution and health. The Lancet, 2017; 391, 462-512

47. Bakulskia K.M., Seob Y.A., Hickman R.C. Heavy Metals Exposure and Alzheimer’s Disease and Related Dementias. Journal of Alzheimer’s Disease xx (20xx) x–xx. ISSN 1387-2877/20/$35.00. DOI 10.3233/JAD-200282

48. Cummings J., Zhou Y., Lee G., et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2024. Alzheimer's Dement. 2024; 10:e12465. https://doi.org/10.1002/trc2.12465

49. Sweeney M., Sagare A., Zlokovic B. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurol 14, 133–150 (2018). https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188

50. Bjørklund G., Dadar M., Mutter J., et al. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. Environ Res. 2017 Nov;159:545-554. doi: 10.1016/j.envres.2017.08.051. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28889024.

51. McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7: 263-269. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005

52. Sachdev P., Blacker D., Blazer D., et al. Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach. Nat Rev Neurol 10, 634–642 (2014). https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.181

53. Guy McKhann MD, David Drachman MD, Marshall Folstein MD, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA Work Group* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology, Volume 34, Number 7, July 01, 1984.

54. Dubois B., Feldman H., Jacova C., et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. The Lancet Neurology, 13, 614-629

55. Albert M.S., DeKosky S.T., Dickson D., et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic

guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 7: 270-279. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008

56. Jack C.R., Bennett Jr., Blennow D.A., et al, NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 14: 535-562. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018

57. Nichols E., Vos, T. The estimation of the global prevalence of dementia from 1990-2019 and forecasted prevalence through 2050: An analysis for the Global Burden of Disease (GBD) study 2019. Alzheimer's Dement., 17: e051496. https://doi.org/10.1002/alz.051496

58. Roehr S, Pabst A, Luck T, Riedel-Heller SG. Is dementia incidence declining in high-income countries? A systematic review and meta-analysis. Clin Epidemiol. 2018 Sep 18;10:1233-1247. doi: 10.2147/CLEP.S163649. PMID: 30271219; PMCID: PMC6149863.

59. Belloy M.E., Napolioni V., Greicius M.D. A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. Neuron. 2019 Mar 6;101(5):820-838. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.056. PMID: 30844401; PMCID: PMC6407643.

60. O'Mahony D., O'Sullivan D., Byrne S., et al. STOPP/START criteria for potentially inappropriate prescribing in older people: version 2, Age and Ageing, Volume 44, Issue 2, March 2015, Pages 213–218, https://doi.org/10.1093/ageing/afu145

61. Ekino S., Susa M., Ninomiya T., et al. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. Journal of the Neurological Sciences, 262, 131-144

62. Ratcliffe H.E., Swanson G.M., Fischer L.J. Human exposure to mercury: a critical assessment of the evidence of adverse health effects. J Toxicol Environ Health. 1996 Oct 25;49(3):221-70. doi: 10.1080/713851079. PMID: 8876653.

63. Clarkson T.W., Magos L., Myers G.J. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. N Engl J Med 2003;349:1731-1737. DOI: 10.1056/NEJMra022471

64. Rooney J.P. The retention time of inorganic mercury in the brain--a systematic review of the evidence. Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Feb 1;274(3):425-35. doi: 10.1016/j.taap.2013.12.011. Epub 2013 Dec 22. PMID: 24368178.

65. Selin N.E. 2009. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. Annual Review of Environment and Resources 34:43-63. https://doi.org/10.1146/annurev.environ.051308.084314

66. ЕкоЗагроза. Офіційний ресурс Міністерства захисту довкілля та природних ресурсів України. Розділ «Атмосферне повітря».

67. Ha E., Basu N., Bose-O'Reilly S., et al. Current progress on understanding the impact of mercury on human health. Environ Res. 2017 Jan;152:419-433. doi: 10.1016/j.envres.2016.06.042. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27444821.

68. Schwartz J.G., Snider T.E., Montiel M.M. Toxicity of a family from vacuumed mercury. The American Journal of Emergency Medicine, Volume 10, Issue 3, 1992, Pages 258-261, ISSN 0735-6757, https://doi.org/10.1016/0735-6757(92)90221-I.

69. Clarkson T.W., Magos L., M.R. Greenwood. The Transport of Elemental Mercury into Fetal Tissues. Biologia Neonatorum (1972) 21 (3-4): 239–244. https://doi.org/10.1159/000240512.

70. Bernhoft R.A., Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature, Journal of Environmental and Public Health, 2012, 460508, 10 pages, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/460508

71. Wu Y.S., Osman A.I., Hosny M., et al. The Toxicity of Mercury and Its Chemical Compounds: Molecular Mechanisms and Environmental and Human Health Implications: A Comprehensive Review. ACS Omega. 2024 Jan

22;9(5):5100-5126. doi: 10.1021/acsomega.3c07047. PMID: 38343989; PMCID: PMC10851382.

72. Bose-O'Reilly S., Mccarty K.M., Steckling-Muschack N., et al. Mercury Exposure and Children's Health. Current problems in pediatric and adolescent health care. 40. 186-215. 10.1016/j.cppeds.2010.07.002.

73. Hamann C.R., Boonchai W., Wen L., et al. Spectrometric analysis of mercury content in 549 skin-lightening products: is mercury toxicity a hidden global health hazard? J Am Acad Dermatol. 2014 Feb;70(2):281-7.e3. doi: 10.1016/j.jaad.2013.09.050. Epub 2013 Dec 8. PMID: 24321702.

74. Bridges C.C., Zalups R.K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. Toxicol Appl Pharmacol. 2005 May 1;204(3):274-308. doi: 10.1016/j.taap.2004.09.007. PMID: 15845419; PMCID: PMC2409291.

75. Bridges C.C., Zalups R.K. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2010;13(5):385-410. doi: 10.1080/10937401003673750. PMID: 20582853; PMCID: PMC6943924.

76. Aschner M., Syversen T., Souza D.O., et al. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. Braz J Med Biol Res. 2007 Mar;40(3):285-91. doi: 10.1590/s0100-879x2007000300001. PMID: 17334523.

77. Yin Z., Jiang H., Syversen T., et al. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. J Neurochem. 2008 Nov;107(4):1083-90. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05683.x. Epub 2008 Sep 13. PMID: 18793329; PMCID: PMC2581650.

78. Nierenberg D.W., Nordgren R.E., Chang M.B., et al. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. N Engl J Med. 1998 Jun 4;338(23):1672-6. doi: 10.1056/NEJM199806043382305. PMID: 9614258.

79. Branco V., Caito S., Farina M., et al. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2017;20(3):119-154. doi: 10.1080/10937404.2017.1289834. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28379072; PMCID: PMC6317349.

80. Caravati E.M., Erdman A.R., Christianson G., et al. American Association of Poison Control Centers. Elemental mercury exposure: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. Clin Toxicol (Phila). 2008 Jan;46(1):1-21. doi: 10.1080/15563650701664731. PMID: 18167033.

81. Risher J.F., De Rosa C.T. Inorganic: the other mercury. J Environ Health. 2007 Nov;70(4):9-16; discussion 40. PMID: 18044248.

82. Park J.D., Zheng W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. J Prev Med Public Health. 2012 Nov;45(6):344-52. doi: 10.3961/jpmph.2012.45.6.344. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23230464; PMCID: PMC3514464.

83. Counter S.A., Buchanan L.H. Mercury exposure in children: a review. Toxicol Appl Pharmacol. 2004 Jul 15;198(2):209-30. doi: 10.1016/j.taap.2003.11.032. PMID: 15236954.

84. Crespo-López M.E., Macêdo G.L., Pereira S.I., et al. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. Pharmacol Res. 2009 Oct;60(4):212-20. doi: 10.1016/j.phrs.2009.02.011. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19446469.

85. Renu K., Chakraborty R., Myakala H., et al. Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity - A review. Chemosphere. 2021 May;271:129735. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33736223.

86. Farina M., Rocha J.B., Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. Life Sci. 2011 Oct

10;89(15-16):555-63. doi: 10.1016/j.lfs.2011.05.019. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21683713; PMCID: PMC3183295.

87. Pollard K.M., Cauvi D.M., Toomey C.B., et al. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2019 Dec;1863(12):129299. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.02.001. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30742953; PMCID: PMC6689266.

88. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. Int. J. Environ. Res. Public Health 2017, 14, 94. https://doi.org/10.3390/ijerph14010094

89. Fu F., Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. J Environ Manage. 2011 Mar;92(3):407-18. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21138785.

90. Femina C.C., Kumar S.P., Saravanan G.A., et al. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review, Journal of Environmental Chemical Engineering, Volume 5, Issue 3, 2017, Pages 2782-2799, ISSN 2213-3437, https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.029.

91. Barakat M.A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. Arabian Journal of Chemistry. 2011. Review Article 4 (4);361-377. doi:10.1016/j.arabjc.2010.07.019

92. Crini G., Lichtfouse E. Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. Environ Chem Lett 17, 145–155 (2019). https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9

93. Wang J., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol Adv. 2009 Mar-Apr;27(2):195-226. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.002. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19103274.

94. Binnemans K., Jones P.T. “Solvometallurgy: An Emerging Branch of Extractive Metallurgy.” Journal of Sustainable Metallurgy 3 (2017): 570-600.

95. El-Nadi Y. Solvent Extraction and Its Applications on Ore Processing and Recovery of Metals: Classical Approach. Separation & Purification Reviews. 46, 2016. 195-215. 10.1080/15422119.2016.1240085.

96. Vladimir K. Solvent Extraction: Classical and Novel Approaches Vladimir S. Kislik Casali Institute of Applied Chemistry The Hebrew University of Jerusalem Campus Givat Ram, Jerusalem 91904, Israel.

97. Matlock M.M., Henke K.R., Atwood D.A. Effectiveness of commercial reagents for heavy metal removal from water with new insights for future chelate designs, Journal of Hazardous Materials, Volume 92, Issue 2, 2002, Pages 129-142, ISSN 0304-3894, https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00389-2.

98. Matlock M.M., Howerton B.S., Atwood D.A. Chemical precipitation of heavy metals from acid mine drainage. Water Res. 2002 Nov;36(19):4757-64. doi: 10.1016/s0043-1354(02)00149-5. PMID: 12448518.

99. Hutchison A., Atwood D., Santilliann-Jiminez Q.E. The removal of mercury from water by open chain ligands containing multiple sulfurs, Journal of Hazardous Materials, Volume 156, Issues 1–3, 2008, Pages 458-465, ISSN 0304-3894, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.042.

100. Feng-He W., Ying-Xue J., Jun-Jie W. Synthesis of heavy metal chelating agent with four chelating groups of N1,N2,N4,N5-tetrakis(2-mercaptoethyl)benzene-1,2,4,5-tetracarboxamide (TMBTCA) and its application for Cu containing wastewater, Journal of Hazardous Materials, Volumes 241–242, 2012, Pages 427-432, ISSN 0304-3894, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.067.

101. Wambugu K., Nyamato G. S., Ogunah J., Ojwach S. O. Phenoxy-imino ligands: coordination chemistry and binding properties with copper(II) cations. Journal of Coordination Chemistry, 74(17–20), 2850–2862 (2021). https://doi.org/10.1080/00958972.2021.2015581

102. Sears M.E. Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification--a review. ScientificWorldJournal. 2013 Apr 18;2013:219840. doi: 10.1155/2013/219840. PMID: 23690738; PMCID: PMC3654245.

103. Cotman C.W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 31, 1974, Pages 445-452, ISSN 0076-6879, ISBN 9780121818944, https://doi.org/10.1016/0076-6879

104. Larson E., Howlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination // Anal. Biochem. – 1986. – V. 155. – P. 243-248. doi:10.1016/0003-2697(86)90432-X.

105. Pastukhov A., Krisanova N., Maksymenko V., et al. Personalized approach in brain protection by hypothermia: individual changes in non-pathological and ischemia-related glutamate transport in brain nerve terminals. // EPMA J. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 26.

106. Pozdnyakova N., Dudarenko M., Borisova T. Age-Dependency of Levetiracetam Effects on Exocytotic GABA Release from Nerve Terminals in the Hippocampus and Cortex in Norm and After Perinatal Hypoxia // Cell. Mol. Neurobiol. – 2019. – Vol. 39, № 5. – P. 701–714.

107. Borysov A., Tarasenko A., Krisanova N., et al. Plastic smoke aerosol: Nano-sized particle distribution, absorption/fluorescent properties, dysregulation of oxidative processes and synaptic transmission in rat brain nerve terminals // Environ. Pollut. – 2020. – V. 263. – Part A. – P. 114502.

108. Holmes P., James KAF., Levy L.S. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? // Sci. Total Environ. – 2009. – Vol. 408. – P.171–182.

109. World Health Organisation. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. 2012. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985

110. Deuschl G., Beghi E., Fazekas F., et al. The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // Lancet Public Heal. – 2020. – Vol. 5, № 10. – P. e551–e567._

111. The Lancet Neurology. Long COVID: understanding the neurological effects. Lancet Neurol. 2021 Apr;20(4):247. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00059-4. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33743226; PMCID: PMC7969137.

112. Fonfría E., Vilaró M.T., Babot Z. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. // J Neurosci Res. – 2005 – Vol. 79. – P. 545–553.

113. Engin A.B., Engin E.D., Golokhvast K. Glutamate-mediated effects of caffeine and interferon-γ on mercury-induced toxicity. // Int J Mol Med. – 2017 – Vol. 39. – P. 1215–1223.

114. Krisanova N., Pastukhov A., Dekaliuk M., et al. Mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals: modulatory effects of carbonaceous airborne particulate simulants. Environ Sci Pollut Res Int. 2024. - 31(3), 3512–3525. https://doi.org/10.1007/S11356-023-31359-X/METRICS.

115. Borisova T. Permanent dynamic transporter-mediated turnover of glutamate across the plasma membrane of presynaptic nerve terminals: arguments in favor and against. // Rev. Neurosci. – 2016. – Vol. 27, № 1. – P. 71–81.

116. 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. – Vol. 24. – N. 21. – P. 17688-17700. doi:10.1007/s11356-017-9414-6.

117. 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. – Vol. 59. – P. 203-215. doi:10.1016/j.biocel.2014.11.016.

118. Borisova T., Krisanova N., Sivko R., et al. Presynaptic malfunction: the neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport. // Neurochem. Int. – 2011. – Vol. 59, № 2. – P. 272–279.

119. Islam N., Saikia B.K. An overview on atmospheric carbonaceous particulate matter into carbon nanomaterials: A new approach for air pollution mitigation // Chemosphere. – 2022. – Vol. 303. – P. 135027.

120. Shatursky O., Demchenko A., Panas I., et al. The ability of carbon nanoparticles to increase transmembrane current of cations coincides with impaired synaptic neurotransmission // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2022. – Vol. 1864. – P. 183817.

121. Orel V.E., Shevchenko A.D., Bogatyreva G.P., et al. Magnetic characteristics and anticancer activity of a nanocomplex consisting of detonation nanodiamond and doxorubicin // J. Superhard Mater. – 2012. – Vol. 34, № 3. – P. 179–185.

122. Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., et al. Neuroactivity of detonation nanodiamonds: dose-dependent changes in transporter-mediated uptake and ambient level of excitatory/inhibitory neurotransmitters in brain nerve terminals. // J. Nanobiotechnology. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 25.

123. Krisanova N., Paliienko K., Pozdnyakova N., et al. “Green” carbon dots from coffee waste for adsorption of xenobiotic and trace heavy metals in both aquatic and physiological media. // Environ. Sci. Nano. - 2025. - V.12, P.4395–4407.

124. Kuznietsova H., Dziubenko N., Paliienko K., et al. A comparative multi-level toxicity assessment of carbon-based Gd-free dots and Gd-doped nanohybrids from coffee waste: hematology, biochemistry, histopathology and neurobiology study // Sci. Rep. – 2023. – Vol. 13, Article number: 9306.

125. S. O. Sotnik, I. M. Pavliei O.O. Pariiska, et al. Amino-grafted mesoporous silica nanoparticles: assessment of neuromodulatory,

membranotropic and antioxidant properties in cortex nerve terminals // Biotechnologia Acta. - 2024. - T. 17, No. 6. - P. 5-14.

126. Xu B., Li S., Shi R., et al. Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for biomedical applications. Signal Transduction and Targeted Therapy, 8(1), 435, 2023. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01654-7

127. S. O. Sotnik, I. M. Pavliei, N. G. Pozdnyakova, et al. Functionalized mesoporous silica nanoparticles: analysis of neurotoxicity and heavy metal detoxication capability. Biotechnologia Acta V. 18, No. 5, 2025, P. 5-13. https://doi.org/10.15407/biotech18.05.005.

Додаток 1

Список публікацій за темою дисертації

Матеріали дисертації опубліковано у 4 наукових статтях у фахових виданнях, в тому числі 2 статті – у міжнародних наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science: Q1 – 1 стаття, Q1/Q2 – 1 статья, та 2 статті– у вітчизняних виданнях категорії «Б», та в 3 тезах доповідей на наукових конференціях.

ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Krisanova N., Pastukhov A., Dekaliuk M., Dudarenko M., Pozdnyakova N., Driuk M., Borisova T. Mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals: modulatory effects of carbonaceous airborne particulate simulants. Environ Sci Pollut Res Int. 2024. - 31(3), 3512–3525. https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-31359-x IF 5.6; Q1/Q2. *Внесок здобувача: експериментальна роботи з наноалмазами, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.*

2. Krisanova N., Paliienko K., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Kalynovska L., Dudarenko M., Borysov A., Skryshevsky V., Lysenko V., Borisova T. “Green” carbon dots from coffee waste for adsorption of xenobiotic and trace heavy metals in both aquatic and physiological media. // Environ. Sci. Nano. - 2025. - V.12, P.4395–4407. https://doi.org/10.1039/D5EN00345H Q1. *Внесок здобувача: методологія та дослідження, супровід експериментальної роботи.*

3. Sotnik S. O., Pavliei I. M., Pariiska O.O., Kurys Y.I., Dudarenko M.V., Borysov A.A., Krisanova N. V., Pozdnyakova N. G., Kalynovska L. M., Driuk M. M., Pastukhov A. O., Tarasenko A. S., Borisova T. A., Koshechko V. G., Kolotilov S. V. Amino-grafted mesoporous silica nanoparticles: assessment of neuromodulatory, membranotropic and antioxidant properties in cortex nerve

terminals // Biotechnologia Acta. - 2024. - T. 17, No. 6. - P. 5-14. https://doi.org/10.15407/biotech17.06.005. Внесок здобувача: отримання препаратів синаптосом, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.

4. Sotnik S. O., Pavliei I. M., Pozdnyakova N. G., Pastukhov A. O., Pariiska O. O., Dudarenko M. V., Krisanova N. V., Sivko R. V., Driuk M. M., Kalynovska L. M., Panas I. D., Borisova T. A., Kolotilov S. V. Functionalized mesoporous silica nanoparticles: analysis of neurotoxicity and heavy metal detoxication capability. Biotechnologia Acta V. 18, No. 5, 2025, P. 5-13. https://doi.org/10.15407/biotech18.05.005. Внесок здобувача: методологія та дослідження, супровід експериментальної роботи.

ПЕРЕЛІК ТЕЗ ДОПОВІДЕЙ НА КОНФЕРЕНЦІЯХ

1. Driuk M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Dudarenko M., Pastukhov A., Borisova T. Prevention of mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve terminals with carbon dots. // Biotechnologia Acta. - 2024. - T. 17, No. 2. - P. 38-40. DOI: https://doi.org/10.15407/biotech17.02.038. *Внесок здобувача:*

супровід експериментальної роботи, аналіз даних.

2. Dudarenko M., Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Driuk M., Panas I., Borisova Modulatory effect of carbon dots on mercury-induced excitotoxicity in presynaptic brain nerve T. terminals // 19th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences, April 11 - 12, 2024. - Bratislava, Slovakia, Abstract book, P. 78. ISBN 978-615-6006-05-9. *Внесок здобувача: супровід експериментальної роботи, аналіз даних.*

3. Dudarenko M.V., Tarasenko A.S., Krisanova N.V., Pozdnyakova N.G., Pastukhov A.O., Driuk M.M., Panas I.D., Borisova T.O. Spontaneous ROS Generation in the Presynaptic Brain Nerve Terminals during Combined Application of Cadmium and Smoke PM Preparations // 20th RECOOP Bridges

in Life Sciences Conferences, April 2 - 3, 2025 Prague, Czech Republic, Abstract book P. 13. ISBN 978-615-6006-06-6. *Внесок здобувача: оптимізація методу отримання водо - суспендованого препарату вуглецевих твердих частинок диму та постійний синтез цього препарату, супровід експериментальної роботи, аналіз даних.*