

УДК 577.156:612.015

Р. А. Новицкий¹, М. Г. Малик¹, В. С. Недзвецкий¹,
Е. В. Сухаренко²

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ
БИОМАРКЕРА СОСТОЯНИЯ ГИДРОБИОНТОВ (НА
ПРИМЕРЕ ПЛОТВЫ ОБЫКНОВЕННОЙ)**

Оценивали прогностическое значение молекулярного цитоскелетного маркера глиального фибриллярного кислого белка в мозге плотвы обыкновенной в условиях повышенной концентрации промышленных загрязнителей Приднепровского региона. Сравнительный анализ состояния глиального цитоскелета гидробионтов днепровских водохранилищ проведен впервые. Обнаружено достоверное повышение экспрессии белка глиальных промежуточных филаментов, что свидетельствует об индуцированном астроглиозе, то есть о функциональном ответе нейроглии на негативное влияние загрязненной водной среды. Предложено рассматривать состояние цитоскелета глиальных клеток позвоночных животных в качестве надежного и достоверного маркера.

Ключевые слова: нейроглия, глиальный цитоскелет, гидробионты, загрязнение, днепровские водохранилища.

Интенсивное развитие современных технологий является основной причиной загрязнения окружающей среды. Воздействие различных по природе веществ вызывает многофакторные изменения в биосистемах. Ионы некоторых металлов и промышленные органические растворители рассматриваются как одни из наиболее токсичных и опасных факторов риска в регионах с высокой концентрацией металлургических и химических предприятий. Даже незначительное повышение концентрации этих загрязнителей ведет к необратимым нарушениям в клетках и тканях живых организмов. Поиск и изучение молекулярных маркеров, которые адекватно и достоверно отображают функциональное состояние клеток, актуальны и необходимы для оценки повреждающих эффектов токсикантов.

Тканеспецифические белки являются ключевыми, жизненно необходимыми макромолекулами для стабильного функционирования всех позвоночных. Именно эти белки необычайно чувствительны к воздействию неблагоприятных факторов. Глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) — основной компонент цитоскелета астроцитов и специфический маркер, изменения экспрессии которого отражают патогенетические нарушения нервной системы.

© Новицкий Р. А., Малик М. Г., Недзвецкий В. С., Сухаренко Е. В., 2009

Целью настоящей работы была оценка прогностического значения молекулярного цитоскелетного маркера ГФКБ в мозге плотвы обыкновенной (*Rutilus rutilus*) в условиях повышенной концентрации промышленных загрязнителей Приднепровского региона. Актуальность работы подчеркивается тем, что сравнительный анализ состояния глиального цитоскелета гидробионтов днепровских водохранилищ проведен впервые.

Материал и методика исследований. Основой для данной статьи послужили комплексные ихтиотоксикологические исследования, сборы материала и наблюдения, проведенные на акватории Днепровского (Запорожского) и Днепродзержинского водохранилищ.

Систематические наблюдения за гидрохимическим состоянием водохранилищ Днепра и рек-притоков (Самара Днепровская) показывают высокий уровень промышленного загрязнения. Содержание некоторых загрязнителей (железо, марганец, никель, кадмий, нефтепродукты) превышает ПДК для водоемов рыбохозяйственного использования в 1,3—5,8 раз [2, 10].

В качестве условно чистого контрольного участка была выбрана акватория нижней части реки Ворсклы (Днепродзержинское водохранилище) в пределах существующего ихтиологического заказника. Ихтиологический материал отбирался из промысловых сетных орудий лова в разные сезоны года, из весенних контрольно-биологических сетных уловов а также любительскими орудиями лова в соответствии с общепринятыми методиками [4].

Проанализировано 27 экз. двухлеток плотвы обыкновенной *Rutilus rutilus*, которые подвергались полному биологическому анализу. Визуально наблюдался фенотип рыб, анализировались морфологические экстерьерные и интерьерные характеристики, отмечались особи с различными морфологическими и физиологическими абберациями. Возраст рыб определялся по чешуе путем подсчета годовых колец по методике Н. И. Чугуновой [9].

Исследование содержания и полипептидного состава цитоскелетного белка астроглии (ГФКБ) проводили иммунохимическим методом. После декапитации головной мозг рыб на холоду гомогенизировали в 10-кратном объеме 50 мМ трис-буфера рН 7,8, содержащего 2 мМ этилендиаминтетраацетата, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида и 5 мМ соевого ингибитора трипсина. Гомогенат центрифугировали 50 мин при 60 000 g и отбирали с надосадочной жидкостью фракцию водорастворимых белков. К полученному осадку добавляли в 4-кратном объеме тот же буфер, содержащий дополнительно 4 М мочевины для экстракции нерастворимых цитоскелетных белков [6]. Центрифугировали 60 мин при 60 000 g и отбирали фракцию водонерастворимых белков. Белки обеих фракций разделяли методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (7—18%) с 0,1% додецилсульфатом натрия [16]. Определение полипептидного состава глиальных филаментов проводили с помощью иммуноблотинга с использованием поликлональной моноспецифической антисыворотки в разведении 1:1500, как описано ранее [18]. Определение относительной интенсивности плотности окраски полипептидных зон проводили с помощью компьютерной обработки сканированных результатов иммуноблотинга.

Количественный анализ ГФКБ проводили путем сравнения интенсивностей окрашивания соответствующих полипептидных зон между экспериментальными и контрольными пробами, отнесенных к количеству общего белка во фракциях. Содержимое общего белка определяли по методу Лоури в модификации Г. Миллера [17].

Обработку полученных данных проводили методами математической статистики для малых выборок [3]. Относительное содержимое ГФКБ выражали в виде средней величины \pm стандартная ошибка средней, достоверное различие между группами оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента ($P < 0,05$) после проверки гипотез о нормальности распределения и различии между генеральными дисперсиями.

Результаты исследований и их обсуждение

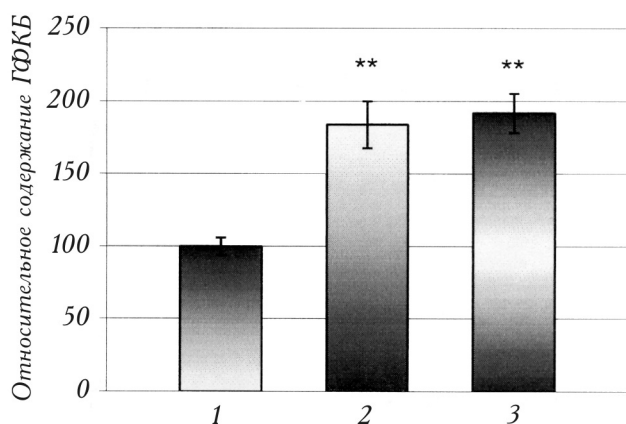
В результате проведенного анатомо-морфологического исследования рыб из разных участков во всех группах не обнаружены отклонения от нормального развития, аберрации и уродства. Результаты количественной оценки содержания белка глиальных промежуточных филаментов в мозге рыб показали значительные отличия исследованных групп (рис. 1).

В мозге плотвы, выловленной в двух загрязненных участках Днепроовского водохранилища (среднее течение и устье р. Самары Днепроовской — левого притока водохранилища), выявлено достоверное возрастание ГФКБ ($P < 0,01$) по сравнению с группой рыб из условно чистого участка (р. Ворскла).

Повышение содержания ГФКБ указывает на развитие астроглиоза в результате метаболических нарушений, которые могут быть вызваны промышленными загрязнителями. Результаты определения полипептидного состава ГФКБ в мозге рыб из загрязненных участков р. Самары Днепроовской и условно чистого участка р. Ворсклы представлены на рисунке 2. Значительное возрастание количества деградированных полипептидов ГФКБ отмечено во всех группах плотвы, выловленных в загрязненных участках. Наиболее значительные изменения ГФКБ выявлены в филаментных фракциях, экстрагированных 4 М мочевиной.

Содержание конечных продуктов перекисного окисления липидов в ткани мозга группы рыб, выловленных на вышеуказанных участках, показало предпосылки развития оксидативного стресса (рис. 3). Показатели оксидативного стресса и цитоскелетных изменений имели высокий коэффициент корреляции ($r = 0,74 \pm 0,091$) при оценке групп рыб из условно чистого участка р. Ворсклы и загрязненных участков р. Самары Днепроовской.

Рыбы являются удобными объектами в экотоксикологических исследованиях в силу своей высокой численности, широкого распространения и доступности для изучения реакции организмов на различные негативные воздействия на экогидросистемы [1, 8]. Известно, что морфологические аномалии не могут служить биомаркерами раннего обнаружения потенциальной опасности антропогенного воздействия на среду, однако, морфологические исследования могут быть важным звеном между физиолого-биохимически-



1. Относительное содержание ГФКБ в мозге плотвы из участков р. Ворсклы (1), устья (2) и среднего течения (3) р. Самара Днепро-вской, $M \pm m$; $n = 5$.

ми и экологическими исследованиями [12, 13]. Актуальной задачей при оценке воздействия промышленного загрязнения является изучение ответных реакций у живых организмов.

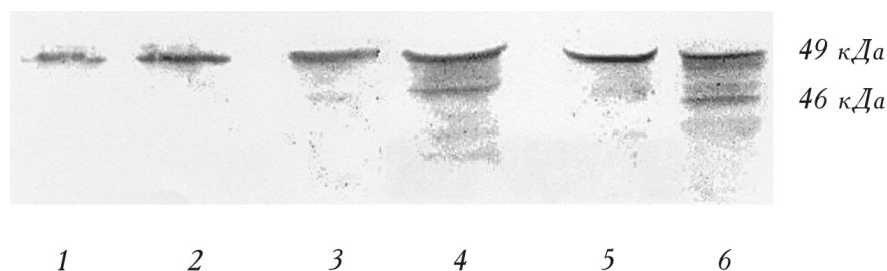
Результаты проведенного анатомо-морфологического исследования плотвы обыкновенной *Rutilus rutilus* из загрязненных (р. Самара Днепро-вская) и условно чистого участков (р. Ворскла) не

выявили существенных различий. Возможно, что этот факт обусловлен непродолжительным сроком жизни молоди плотвы обыкновенной (двухлетки) и пролонгированными эффектами большинства промышленных загрязнителей.

В современных условиях практически все экосистемы подвержены неблагоприятному влиянию, обусловленному глобальным антропогенным воздействием на биосферу. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования молекулярных процессов, которые лежат в основе физиологических, репродукционных и других биологических процессов.

Изменения в биосистемах проявляются на различных уровнях иерархии: на молекулярном — в виде модуляции экспрессии отдельных генов и молекулярных перестроек; на клеточном уровне — в форме изменений биохимических процессов; на организменном уровне — в форме изменений физиологических и поведенческих реакций; на субпопуляционном, популяционном и уровне биотического сообщества — в изменении состава функциональных групп, смене доминант, изменении цепей питания. Нарушения на молекулярном уровне, естественно, отражаются на всех более высоких уровнях, в том числе и структурно-функциональной организации экосистем. Программы биологического мониторинга все активнее включают использование различных биомаркеров.

Исследования биохимических и физиологических параметров для биологической оценки влияния загрязнения на окружающую среду [5, 7] показали перспективность применения биомаркеров. Все эффекты в биосистемах начинаются с химических взаимодействий на молекулярном уровне. Поэтому принципиально важным является выявление нарушений уже на молекулярном уровне, до их последующей реализации в следующих уровнях организации, когда неблагоприятные изменения приобретают необра-



2. Результаты иммуноблотинга ГФКБ экстрактов мозга плотвы из участков р. Ворсклы (1—2), устья (3—4) и среднего течения (5—6) р. Самары Днепроvской.

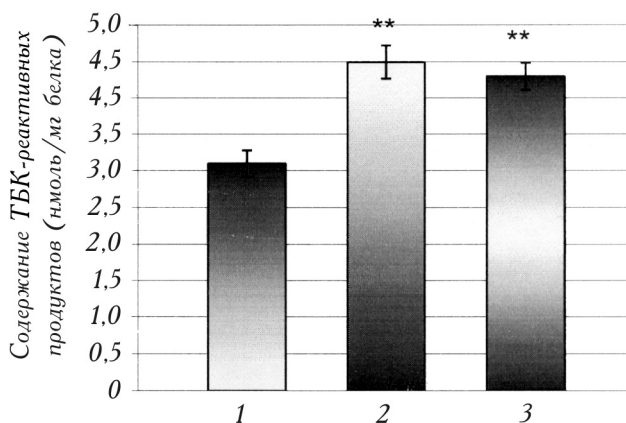
тимый характер. Мониторинг с использованием биомаркеров предоставит возможность вовремя выявлять и предупреждать развитие патологических процессов в экосистеме.

В последнее время серьезное внимание уделяется возможному использованию структурных молекулярных компонентов в качестве индикаторов функционального состояния различных

типов клеток. Наиболее перспективными биомаркерами рассматриваются гистоспецифические цитоскелетные белки нервной ткани [5]. Во-первых, эти белки выполняют специфические жизненно необходимые функции нервной системы. Во-вторых, белки нервных клеток необычайно чувствительны к воздействию неблагоприятных факторов.

Глиальные клетки обнаружены в нервной ткани самых различных биологических видов. Лучеперые рыбы (*Actinopterygii*) представляют отдельный путь развития позвоночных. Их мозг имеет очень сложную макроскопическую структуру, некоторые отделы не имеют соответствующих структур у тетрапод или же имеют очень отличную морфологию [14]. В то же время мозг рыб имеет высоко специализированную глиальную архитектуру. Астроциты мозга рыб сходны по морфологии, биохимическим и физиологическим свойствам с астроцитами мозга млекопитающих [15].

Сравнительный анализ ГФКБ-позитивных клеток в мозге различных видов показал их присутствие в большинстве отделов мозга рептилий, пресмыкающихся, птиц и млекопитающих. Представительство и локализация аст-



3. Содержание ТБК-реактивных продуктов в мозге плотвы из участков р. Ворсклы (1), устья (2) и среднего течения (3) р. Самары Днепроvской, $M \pm m$; $n = 5$.

роцитов имеют классоспецифические особенности, однако цитоскелетный белок ГФКБ в этих клетках высоко консервативен по структуре и функциям.

Как и у других биологических видов, у рыб нейроглия играет жизненно важную роль в поддержании и обеспечении функционирования нейронов. Особенно важна она для поддержания гомеостаза в мозге, репарации повреждений, защиты нейронов от различных воздействий. Неблагоприятные воздействия различной природы индуцируют характерный клеточный ответ глии — астроглиоз. Астроглиоз, т. е. реактивация астроцитов, всегда сопровождается активацией фибриллогенеза и синтеза ГФКБ [20]. Чрезмерно интенсивный фибриллогенез является главным показателем реактивного ответа астроцитов на нейрональные повреждения. Перестройка промежуточных филаментов астроглии может быть необходимым условием для адекватного функционирования глиальных клеток при воздействии повреждающих факторов [19].

Выявленное нами достоверное повышение экспрессии белка глиальных промежуточных филаментов свидетельствует об индуцированном астроглиозе, т. е. функциональном ответе нейроглии на неблагоприятное воздействие. Характерное увеличение количества деградированных полипептидных фрагментов ГФКБ является признаком цитоскелетных перестроек, нарушения состояния цитоскелета, морфологии и функционирования клеток нервной ткани. Таким образом, состояние глиального цитоскелета может быть показателем токсического воздействия промышленных загрязнителей.

Мозг и нервная система рассматриваются как наиболее подверженные оксидативным повреждениям по сравнению с другими тканями вследствие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах нервной паренхимы, высокого уровня утилизации кислорода (примерно 1/5 общего потребления).

Оксидативный стресс рассматривается одним из наиболее распространенных метаболических нарушений при действии неблагоприятных факторов [11]. В то же время промежуточные высоко реактивные продукты, образующиеся в ходе развития оксидативного стресса, являются важной причиной нейродегенерации и снижения жизнеспособности в условиях действия токсических загрязнителей различной природы. Действие промышленных загрязнителей на организм вызывает нарушения энергетического метаболизма в клетках, морфологические и структурные аномалии.

Выявленная положительная корреляция показателей астроглиоза, т.е. состояния цитоскелета нейроглии, и оксидативного стресса в мозге плотвы из промышленно загрязненных и условно чистых участков указывает на то, что окислительные повреждения могут быть одним из основных механизмов реализации токсичных эффектов загрязнителей.

Заключение

Полученные данные позволяют рассматривать состояние цитоскелета глиальных клеток в качестве надежного и достоверного маркера. Цитоскелетные пере-

стройки характерно отражают неблагоприятное влияние антропогенных факторов внешней среды на различные биологические виды.

**

*Оцінювали прогностичне значення молекулярного цитоскелетного маркера гліального фібрилярного кислого білка у мозку плітки звичайної (*Rutilus rutilus*) в умовах підвищеної концентрації промислових забруднювачів Придніпровського регіону. Порівняльний аналіз стану гліального цитоскелета гідробіонтів дніпровських водосховищ проведено вперше. Знайдено вірогідне підвищення експресії білка гліальних проміжних філаментів, що свідчить про індукований астрогліоз, тобто про функціональну відповідь нейроглії на негативний вплив забрудненого водного середовища. Запропоновано розглядати стан цитоскелета гліальних клітин хребетних тварин як надійний та достовірний маркер.*

**

*Prognostic significance of the glial fibrillary acidic protein — molecular cytoskeletal marker in the brain of the common roach *Rutilus rutilus*, under condition of increased industrial pollutants in the Dnieper region is evaluated. A comparative analysis of the hydrobionts glial cytoskeleton state in the Dnieper reservoirs is taken for the first time. An apparent increase of the glial intermediate filaments protein expression that is an evidence of induced astrogliosis, i. e. neuroglial functional response to the polluted water environment is found. The state of the glial cells cytoskeleton in vertebrates is proposed as a reliable and presumptive marker.*

**

1. Жукінський В.Н., Вятчанина Л.И., Щербуха А.Я. Формализованная характеристика ихтиофауны Украины для оценки ее состава и состояния популяции // Гидробиол. журн. — 1995. — Т. 31, № 4. — С. 17—41.
2. Звіт про стан навколишнього природного середовища в Дніпропетровській області за 2005 рік. — Д.: УПРЕ, 2006. — 173 с.
3. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 7, № 6. — С. 776—791.
4. Методика збору й обробки іхтіологічних і гідробиологічних матеріалів із метою визначення лімітів промислового вилову риби із великих водосховищ і лиманів України. — К.: Ін-т риб. госп-ва, 1998. — 47 с.
5. Негзвецький В.С., Тихомиров А.А., Кириченко С.В. и др. Возможности использования молекулярных компонентов с целью сохранения биологического разнообразия в условиях действия неблагоприятных факторов // Экология та ноосферология. — 2005. — Т. 16, № 3—4. — С. 215—221.
6. Негзвецький В.С., Неруш П.О., Тихомиров А.О. та ін. Вплив іонізуючого випромінювання і хлориду алюмінію на білок проміжних філаментів глії головного мозку щурів // Нейрофізіологія. — 2001. — Т. 33, № 1. — С. 33—38.
7. Новицький Р.А., Гассо В.Я. Морфологические аномалии рыб Днепровского водохранилища (на примере берша *Stizostedion volgensis* (Gmelin, 1788)) // Вестн. зоологии. — 1999. — Т. 33, № 1. — С. 69—74.
8. Савваитова К.А., Чеботарева Ю.В., Пичугин М.Ю., Максимов С.В. Аномалии в строении рыб как показатели состояния природной среды // Вопр. ихтиологии. — 1995. — Т. 35, № 2. — С. 182—188.

9. Чугунова Н.И. Методика изучения возраста и роста рыб. — М., 1952. — 175 с.
10. Экологические основы природопользования. — Д.: ИППЭ НАН Украины, 1998. — 409 с.
11. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M. et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring // Int. J. Dev. Neurosci. — 2007. — Vol. 25, N 3. — P. 133.
12. Bucher F., Hofer R., Salvenmoser W. Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 1992. — Vol. 23. — P. 410—419.
13. De Knecht J.A., van Brummelen T.C. Biological assessment of the presence and effects of new and unknown organic contaminants in the environment // ACES Sci. Report. Vrije Univ. — Amsterdam, 1997. — P. 9.
14. Kalman M. Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP) // Anat. Embriol. (Berl.). — 1998. — Vol. 198, N 5. — P. 409.
15. Kalman M., Pritz M. Glial Fibrillary Acidic Protein-Immunopositive Structures in the Brain of a Crocodilian, *Caiman crocodilus*, and its Bearing on the Evolution of Astroglia // J. Comparative Neurology. — 2001. — Vol. 431. — P. 460—480.
16. Laemmli O.H. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227, N 1. — P. 243—246.
17. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. — 1959. — Vol. 31, N 5. — P. 964—966.
18. Nedzvetskii V.S., Tuzcu M., Yasar A. et al. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats // Biochemistry. — 2006. — Vol. 71, N 3. — P. 239—244.
19. Norton W.T., Aquino D.A., Hozumi I. et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review // Neurochem. Res. — 1992. — Vol. 17, N 9. — P. 877—885.
20. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A.A. et al. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function // Trends Neurosci. — 1997. — Vol. 20, N 12. — P. 570—577.

¹ Днепропетровский национальный университет

² Керченский морской технологический университет

Поступила 16.09.08