

СОСТОЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ МОЗГА ПРЫТКОЙ ЯЩЕРИЦЫ КАК БИОМАРКЕР НАРУШЕНИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ПРОМЫШЛЕННЫМ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ

Днепропетровский национальный университет им. О. Гончара

Изучено содержание глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) цитоскелетной и мембранной фракции в астроцитах мозга прыткой ящерицы из трех биогеоценозов, находящихся в условиях различного уровня промышленного загрязнения среды. Различия в экспрессии ГФКБ свидетельствует о значительных метаболических нарушениях в нервной системе, вызванных действием загрязнителей среды. Показано, что состояние цитоскелета глиальных клеток ящериц можно использовать как надежный биомаркер неблагоприятного воздействия промышленного загрязнения.

Ключевые слова: прыткая ящерица, глиальный фибриллярный кислый белок, биомаркер, загрязнение среды.

В. Я. Гассо, О. Ю. Клименко, В. С. Недзвецкий

Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара

СТАН ЦИТОСКЕЛЕТНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПОНЕНТІВ МОЗКУ ПРУДКОЇ ЯЩІРКИ ЯК БІОМАРКЕР ПОРУШЕНЬ, ЩО ІНДУКОВАНІ ПРОМИСЛОВИМ ЗАБРУДНЕННЯМ

Досліджено вміст гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) цитоскелетної та мембранної фракції в астроцитах мозку прудкої ящірки з трьох біогеоценозів, що знаходяться в умовах різного рівня промислового забруднення довкілля. Відмінності в експресії ГФКБ свідчать про значні метаболічні порушення в нервовій системі, які викликані впливом забруднювачів середовища. Показано, що стан цитоскелету гліальних клітин ящірок можна використовувати як надійний біомаркер негативного впливу промислового забруднення.

Ключові слова: прудка ящірка, гліальний фібрилярний кислий білок, біомаркер, забруднення середовища.

V. Y. Gasso, O. Y. Klymenko, V. S. Nedzvetsky

O. Gonchar Dnipropetrovsk National University

CYTOSKELETON MOLECULAR COMPONENTS OF SAND LIZARD'S BRAIN AS A BIOMARKER OF DISORDERS INDUCED BY INDUSTRIAL POLLUTION

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) content has been studied in cytoskeleton and membrane fractions of sand lizard's brain astrocytes from three ecosystems of different pollution levels. Changes in the GFAP expression argue for considerable metabolic disorders in the nervous system induced by environmental pollutants influence. State of the cytoskeleton glial cells of lizards is proved to be a reliable biomarker of unfavourable effects of industrial pollution.

Key words: sand lizard, glial fibrillary acidic protein, biomarker, environmental pollution.

Множество различных по природе загрязнителей вследствие экстенсивного развития промышленного производства и химизации сельского хозяйства оказывает неблагоприятное воздействие на живые организмы. В результате происходят разнообразные изменения в биосистемах на всех уровнях организации живого. На молекулярном уровне – это модуляция экспрессии отдельных генов и молекулярные перестройки, на клеточном – изменения биохимических процессов и цитоскелетные перестройки, на уровне целостного организма – изменения физиологических и поведенческих реакций. На популяционном уровне происходят изменения структуры популяции, как правило, снижается ее численность и площадь занимаемой территории. В основе большинства этих и других нарушений лежат биохимические и молекулярные процессы. Отклонения от равновесия в системах на молекулярном уровне, при

достаточной амплитуде изменений, впоследствии отражаются на всех более высоких уровнях, в том числе и на структурно-функциональной организации биогеоценоза.

Современные программы биологического мониторинга все активнее включают использование различных биомаркеров. Ряд методов (морфологический, патолого-анатомический, гистологический) могут быть полезными в качестве индикаторов неблагоприятных последствий антропогенного воздействия на окружающую среду. Во многих случаях наиболее эффективными являются биохимические и молекулярные маркеры, так как могут служить биомаркерами нарушений, происходящих на самых ранних стадиях (Биотест, 1993).

Состояние окружающей среды Приднепровского региона характеризуется высоким уровнем промышленного загрязнения. Содержание некоторых загрязнителей (тяжелые металлы, нефтепродукты, органические растворители) превышает ПДК для почвы и водоемов в 1,3–5,8 раза (Звіт, 2006).

Ионы некоторых тяжелых металлов и органические растворители рассматриваются как одни из наиболее опасных факторов риска в регионах с высокой концентрацией металлургических и химических предприятий. Повышение концентрации этих загрязнителей может приводить к необратимым нарушениям в клетках и тканях живых организмов.

Нейроны и глиальные клетки чрезвычайно чувствительны к действию токсиантов различной природы. Практически любая интоксикация в той или иной степени сопровождается нарушениями функций нервной системы. Таким образом, центральная нервная система представляет собой потенциальную мишень для действия экотоксикантов (Куценко, 2004).

В центральной нервной системе глиальные клетки представлены астроцитами, олигодендроцитами и клетками микроглии. Астроциты особенно важны для функционирования и поддержания жизнеспособности нейронов. На протяжении всей жизни животных и человека они сохраняют способность к делению, которая особенно ярко проявляется при различных нарушениях и повреждениях нервной системы. Характерной особенностью астроцитов является строение их цитоскелета. Особое значение в формировании цитоскелета, обеспечении специфической морфологии клеток нервной ткани имеют промежуточные филаменты (Ультраструктура, 1972).

Промежуточные филаменты астроцитов построены из глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ). В последние годы показано, что экспрессия этого специфического маркера астроглии в значительной степени модулируется различными по своей природе факторами (Недзвецкий, 2001; Недзвецкий, 2005).

Большинство тканеспецифических белков являются ключевыми, жизненно необходимыми макромолекулами для стабильного протекания жизненных процессов. Именно эти белки часто оказываются чувствительными к воздействию неблагоприятных факторов среды, в том числе и экотоксикантов.

Изучение и выбор молекулярных маркеров, которые адекватно и достоверно отображают функциональное состояние клеток, а опосредованно и организма в целом, актуальны и необходимы для оценки повреждающих эффектов экотоксикантов.

Цель настоящей работы – оценка возможного прогностического значения уровня экспрессии и состояния молекулярного цитоскелетного маркера ГФКБ в мозге прыткой ящерицы (*Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 (*Reptilia, Squamata*)) в условиях повышенной концентрации промышленных загрязнителей Приднепровского региона.

Актуальность работы подчеркивается тем, что сравнительный анализ состояния глиального цитоскелета прыткой ящерицы в условиях промышленного загрязнения и для Приднепровского региона выполнен впервые.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были отобраны половозрелые особи прыткой ящерицы. В качестве условно чистого, контрольного участка были выбраны биотопы Присамарского международного биосферного стационара им. А. Л. Бельгарда (Новомосковский р-н Днепропетровской обл.).

В качестве загрязненного района была выбрана зона промышленного загрязнения, подверженная выбросам химических (Приднепровский химический завод, Химобъединение «Азот») и металлургического (Днепродзержинский металлургический комбинат) предприятий г. Днепродзержинска в районе устья р. Коноплянка на полуострове Гречаный.

Кроме того, проводились исследования в деструктивных экосистемах Западного Донбасса, нарушенных горношахтными разработками, но подвергшихся спланированной лесной рекультивации для восстановления нарушенных земель.

Животные были отобраны в соответствии с общепринятыми методиками сбора (Булахов и др., 2007). Для получения биологического материала использовали метод, принятый для работы с мелкими животными, – декапитацию (Тухомугов, 2008).

После декапитации извлекали головной мозг, гомогенизировали ткань на холоду в 10-кратном объеме 50 мМ трис-буфера pH 7,8, содержащего 2 мМ этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенил-метилсульфонилфторид (PMSF) и 5 мМ соевый ингибитор трипсина. Гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге 50 мин., при 60 000 g, полученный супернатант (S1) после центрифугирования содержал растворимые белки.

Для экстракции цитоскелетных белков к полученному осадку добавляли 4-кратный объем трис-буфера, содержащего дополнительно 4 М мочевины. Для экстракции мембранных белков полученный осадок ресуспендировали в 4-кратном объеме с тем же буфером, который дополнительно содержал Гритон X-100. Затем повторно центрифугировали 60 мин., при 60 000 g (Baydas et al, 2003; Kalman, 2001).

Белки обеих фракций разделяли методом электрофореза в градиенте полиакриламидного геля (7–18 %) с 0,1 % додецилсульфата натрия.

Исследование содержания и полипептидного состава цитоскелетного белка астроглии (ГФКБ) проводили иммунохимическими методами – с помощью иммуноблоттинга и иммуноэлектрофореза. Определение полипептидного состава глиальных филаментов проводили с помощью иммуноблоттинга с использованием моноспецифической антисыворотки (Ленинджер, 1985; Виноградова, 1983).

Количественный анализ ГФКБ проводили с помощью определения относительной интенсивности плотности окраски полипептидных зон, которую оценивали с помощью сканирования и компьютерной обработки результатов иммуноблоттинга.

Обработку полученных данных проводили методами математической статистики для малых выборок (Кокунин, 1975). Относительное содержание ГФКБ выражали в виде средней величины плюс(минус) стандартная ошибка средней, достоверные отличия между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$) после проверки гипотез о нормальности распределения и различия между генеральными дисперсиями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В мозге рептилий, обитающих в условиях промышленного загрязнения (г. Днепродзержинск, г. Павлоград), выявлено статистически достоверное более высокое содержание ГФКБ по сравнению с группой рептилий, отловленных на контрольных участках (Присамарский стационар). Результаты определения содержания ГФКБ в мозге животных из исследованных участков Днепропетровской области представлены на рис. 1.

Повышение содержания ГФКБ в мозге ящериц указывает на развитие астроглиоза – реактивного ответа глии, включающего ряд сложных изменений в морфологии и функциях астроцитов, что отражается на метаболической способности нейронов и может вести к нарушениям функций ЦНС. Астроциты участвуют в формировании глиальной оболочки и замещают погибшие в результате метаболических нарушений нейроны.

Значительное возрастание количества деградированных полипептидных фрагментов, которые образуются в результате протеолитического расщепления цитоскелетных структур, свидетельствует об активации цитоскелетных перестроек и морфологических изменениях. В отличие от астроглиоза, подобный процесс сопровождается снижением содержания ГФКБ во фракции нерастворимых цитоскелетных белков, что и было отмечено у рептилий, отловленных на загрязненном участке.

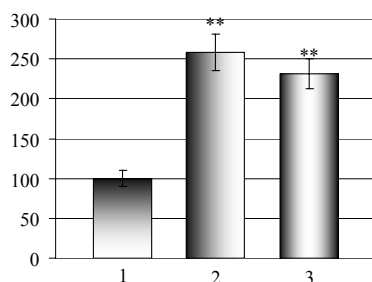


Рис. 1. Содержание ГФКБ в цитоскелетной фракции белков мозга прыткой ящерицы:
 1 – Присамарский международный биосферный стационар им. А. Л. Бельгарда – контроль;
 2 – зона промышленного загрязнения (г. Днепродзержинск);
 3 – зона лесной рекультивации шахтных отвалов (г. Павлоград)

Наиболее значительные изменения ГФКБ выявлены в цитоскелетных фракциях, экстрагированных 4 М мочевиной (рис. 1, 2). Учитывая тот факт, что цитоскелетная (нерастворимая) фракция по содержанию намного превосходит мембранную фракцию ГФКБ, полученные данные свидетельствуют, что промышленное загрязнение индуцирует значительные нарушения в достаточно устойчивых цитоскелетных структурах астроцитов мозга пресмыкающихся.

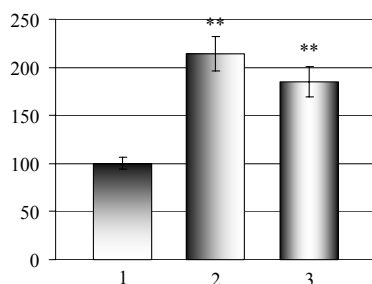


Рис. 2. Содержание ГФКБ в мембранной фракции белков мозга прыткой ящерицы:
 1 – Присамарский международный биосферный стационар им. А. Л. Бельгарда – контроль;
 2 – зона промышленного загрязнения (г. Днепродзержинск);
 3 – зона лесной рекультивации шахтных отвалов (г. Павлоград)

Широкое распространение прыткой ящерицы, высокая численность этих пресмыкающихся во многих биогеоценозах делает этот биологический вид удобным объектом для экотоксикологических исследований. В настоящее время прыткая ящерица уже является одним из модельных биологических видов по программе МАВ. В силу достаточно широкого распространения и доступности прыткой ящерицы перспективно использование этого вида для изучения реакций организмов на негативные воздействия в биогеоценозах с целью индикации таких воздействий.

Полученные результаты показали значительные достоверные различия в содержании ГФКБ, в мозге животных из условно чистого и загрязненных регионов. Различия были выявлены для обеих белковых фракций – цитоскелетной и мембранной. Увеличение количества белка глиальных промежуточных филаментов во фракции, экстрагированной мочевиной, свидетельствует о более интенсивном синтезе ГФКБ и фибрилогенезе. Подобная активация характерна для индуцированного астроглиоза. Индукция астроглиального реактивного ответа, вероятнее всего, вызвана комплексом неблагоприятных факторов в регионах Днепродзержинска и Павлограда. Во фракции белков, экстрагированных тритоном X-100, также выявлены достоверные различия содержания ГФКБ в мозге ящериц, взятых из условно чистого и загрязненных регионов.

Следует отметить, что более значительные отличия содержания ГФКБ обнаружены в мембранных фракциях мозга животных, взятых из загрязненного региона Днепродзержинска по сравнению с условно чистым регионом – Присамарским международным биосферным стационаром.

Предполагают, что субъединицы цитоскелетных белков, которые экстрагируются детергентами, ассоциированы с мембранными структурами и выполняют не только опорную функцию цитоскелета, но, возможно, отвечают за взаимодействие цитоскелетных структур с мембранными белками. Сравнительный анализ соотношения содержания ГФКБ в мембранной и цитоскелетной фракциях представлены на рис. 3. Несмотря на различия содержания ГФКБ в мозге животных, взятых из загрязненных регионов Днепродзержинска и Павлограда, коэффициент практически совпадает.

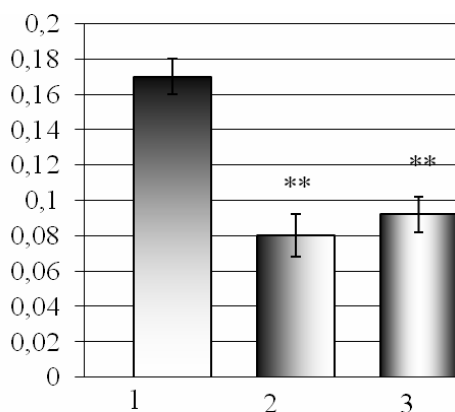


Рис. 3. Соотношение содержания ГФКБ мембранной и цитоскелетной фракции в мозге прыткой ящерицы:

- 1 – Присамарский международный биосферный стационар им. А. Л. Бельгарда – контроль;
 2 – зона промышленного загрязнения (г. Днепродзержинск);
 3 – зона лесной рекультивации шахтных отвалов (г. Павлоград)

В то же время по сравнению с мозгом животных из условно чистого региона соотношение ГФКБ мембранной и цитоскелетной фракции существенно ниже для мозга ящериц из загрязненных регионов.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что комплексы неблагоприятных факторов техногенных регионов могут индуцировать сходные, общие механизмы клеточного и молекулярного ответов на экотоксическое воздействие.

Актуальной задачей при оценке воздействия промышленного загрязнения является изучение соответствующих эффектов у живых организмов.

Исследования биохимических и физиологических параметров для биологической оценки влияния загрязнения на окружающую среду показали перспективность применения биомаркеров. Принципиально важным является выявление нарушений уже на молекулярном уровне, до их последующей реализации на более высоких уровнях организации, когда неблагоприятные изменения приобретают необратимый 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. Среди наиболее перспективных биомаркеров рассматриваются гистоспецифические цитоскелетные белки нервной ткани. Во-первых, эти белки выполняют специфические, жизненно необходимые функции нервной системы. Во-вторых, белки нейронов необычайно чувствительны к воздействию неблагоприятных факторов.

Глиальные клетки обнаружены в нервной ткани самых различных биологических видов (Nedzvetskii, 2006). У рептилий мозг имеет достаточно сложную макроскопическую структуру, некоторые отделы имеют отличную от других тетрапод морфологию. В то же время мозг пресмыкающихся имеет высокоспециализированную глиальную архитектуру. Астроциты мозга рептилий сходны по морфологии, биохимическим и физиологическим свойствам с астроцитами мозга млекопитающих (Kalman, 2001).

Сравнительный анализ ГФКБ-позитивных клеток в мозге различных видов показал их присутствие в большинстве отделов мозга рыб и млекопитающих (Baydas et al, 2003; Kalman, 2001; Tykhomyrov et al, 2008; Недзвецкий, 2001). Представительство и локализация астроцитов имеют классоспецифические особенности, однако цитоскелетный белок ГФКБ в этих клетках высоко консервативен по структуре и выполняемым функциям (Tykhomyrov et al, 2008, Nedzvetskii, 2006).

Так же как и у других биологических видов, у рептилий нейроглия играет жизненно важную роль в поддержании и обеспечении функционирования нейронов. Особенно важны клетки нейроглии 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. 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.

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.

Результаты исследования состояния цитоскелета нейроглии в мозге рептилий из промышленно загрязненного и условно чистых участков указывают на то, что подобные специфические молекулярные повреждения могут быть одним из основных механизмов реализации токсичных эффектов загрязнителей. Выявленная положительная корреляция показателей астроглиоза в мозге рептилий из экосистем с различным уровнем загрязнения указывает на то, что эти нарушения состояния цитоскелета могут рассматриваться в качестве валидного биомаркера системных патологических изменений.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что промышленные загрязнители вызывают развитие астроглиоза. Цитоскелетные перестройки в глиальных клетках характерно отражают неблагоприятное влияние антропогенных факторов внешней среды на пресмыкающихся, в частности на особи прыткой ящерицы. Полученные данные позволяют рассматривать состояние цитоскелета глиальных клеток в качестве надежного и достоверного маркера неблагоприятного воздействия факторов окружающей среды.

Выявленные изменения в экспрессии ГФКБ свидетельствуют о значительных метаболических нарушениях, вызванных действием стрессовых факторов, в нервной системе прыткой ящерицы из исследуемых регионов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Биотест интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов / В. М. Захаров, Д. М. Кларк. – М., 1993. – С. 67.

Булахов В. Л. Біологічне різноманіття України. Дніпропетровська область. Земноводні і плазуни / В. Л. Булахов, В. Я. Гассо, О. Є. Пахомов. – Д. : Вид-во ДНУ. 2007. – 420 с.

- Виноградова Р. П.** Физико-химические методы в биохимии / Р. П. Виноградова, Б. А. Цудзевич, С. Н. Храпунов. – К. : Вища шк., 1983. – 286 с.
- Звіт** про стан навколишнього природного середовища в Дніпропетровській області за 2005 рік. – Д., 2006. – 173 с.
- Кокунин В. А.** Статистическая обработка данных при малом числе опытов / В. А. Кокунин // Укр. биохим. журн. – 1975. – № 6. – С. 776-791.
- Куценко С. А.** Основы токсикологии / С. А. Куценко. – СПб., 2004. – 720 с.
- Ленинджер А.** Основы биохимии (в 3-х т.) / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1985. – Т. 2. – С. 371.
- Недзвецкий В. С.** Вплив іонізуючого випромінювання і хлориду алюмінію на білок проміжних філаментів глії головного мозку щурів / В. С. Недзвецкий, П. О. Неруш, А. О. Тихомиров та ін. // Нейрофізіологія. – 2001 (33). – № 1. – С. 33-38.
- Недзвецкий В. С.** Возможности использования молекулярных компонентов с целью сохранения биологического разнообразия в условиях действия неблагоприятных факторов / В. С. Недзвецкий, А. А. Тихомиров, С. В. Кириченко, Ж. А. Корякина, М. В. Липка // Экология та ноосферология. – 2005. – Т. 16, № 3-4. – С. 215-221.
- Ультраструктура** нервной системы / А. Питерс, С. Палей, Г. Уэбстер / Под ред. проф. Г. Д. Смирнова. – М. : Мир, 1972. – 175 с.
- Baydas G.** Melatonin protects the central nervous of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R. J. Reiter, V. S. Nedzvetskii // Toxicology Letters, 2003. – V. 137. – P.169-174.
- Kalman M.** Immunohistochemical investigation of actin-anchoring proteins vinculin, talin and paxillin in rat brain following lesion: a moderate reaction, confined to the astroglia of brain tracts / M. Kalman, A. Szabo // Exp Brain Res (2001) 139:426-434.
- Nedzvetskii V. S.** Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats / V. S. Nedzvetskii, M. Tuzcu, A. Yasar, A. A. Tikhomirov, G. Baydas // Biochemistry (Moscow). – 2006. – V. 71, № 3. – P. 239-244.
- Tykhomyrov A. A.** Nanostructures of hydrated C60 fullerene (C60HyFn) protect rat brain against alcohol impact and attenuate behavioral impairments of alcoholized animals / A. A. Tykhomyrov, V. S. Nedzvetsky, V. K. Klochkov, G. V. Andrievsky // Toxicology. – 2008. – V. 246, № (2-3). – P. 158-165.

Надійшла до редколегії 09.02.10