

15. Kholiyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G. design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*. *Biotechnology in Russia*, 2012, no. 6, pp. 31-41.

16. Holyavka M.G., Evstigneev M.P., Artyukhov V.G., Savin V.V. Development of heterogeneous preparation with inulinase for tubular reactor systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, vol. 129, pp. 1-5.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ РЫБ РАЗЛИЧНЫХ ПЕЛАГИЧЕСКИХ ЗОН

Сухаренко Е.В.¹, Недзвецкий В.С.²

¹Керченский государственный морской технологический университет
ул. Орджоникидзе, 82, г. Керчь, 238309, РФ
e-mail: helenasuhar@gmail.com

²Бингельский университет
ул. Селахаддин-и Эйюби Мах. Айдинлик Кад, Бингель, 12000, Турция
e-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Аннотация. Исследовали нейротоксические эффекты (в течение 45 суток) повышенных концентраций хлорида алюминия (10 мг/л) на интенсивность оксидативного стресса и содержание астроцит-специфических белков (цитоскелетного ГФКБ и цитозольного кальций-связывающего протеина S100 β) особей рыб различных пелагических зон (солнечного окуня, карася, плотвы обыкновенной, бычка-песочника). Определены отличия показателей оксидативного стресса в печени и головном мозге рыб в модельных условиях интоксикации ионами алюминия. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности клеток нервной ткани к действию ионов алюминия. Установлено, что ионы алюминия индуцируют в головном мозге рыб достоверное повышение уровня конечных продуктов ПОЛ, рост активности ферментов антиоксидантной защиты, реактивацию глиальных клеток, повышение экспрессии ГФКБ и протеина S100 β , увеличение содержания полипептидных фрагментов астроцит-специфических белков в результате их ограниченного протеолиза. Представленные результаты свидетельствуют о развитии характерной астроглиальной реакции в ответ на хроническое воздействие хлорида алюминия в головном мозге рыб различных пелагических зон.

Ключевые слова: гидробионты, оксидативный стресс, нейроспецифические белки, глиальный фибриллярный кислый белок, протеин S100 β .

MOLECULAR MECHANISMS OF ALUMINIUM IONS NEUROTOXICITY IN BRAIN CELLS OF FISH FROM DIFFERENT PELAGIC AREAS

Sukharenc E.V.¹, Nedzvetsky V.S.²

¹Kerch state marine technological university,
Ordjonikidze str., 82, Kerch, 238309, Russia
e-mail: helenasuhar@gmail.com

²Bingol university,
Selahaddin-i Eyyubi Mah. Aydınlık Cad., 12000, Bingöl, Turkey,
e-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Abstract. Neurotoxic effects of aluminum chloride in heightened concentration (10 mg/L) were studied in a brain of fish from different pelagic areas, especially sun fish, carasius, roach, and bullhead. The intensity of oxidative stress and the content of both cytoskeleton protein GFAP and cytosol Ca-binding protein S100 β were determined. The differences in oxidative stress data were observed in liver and brain of fish while 45 days treatment with aluminum chloride. Obtained data showed high sensitivity of neural tissue cells to exposure of aluminium ions. There was observed that aluminum ions induce integrated changes, especially more eminent of them - reliable increase of final LPO products, a rising of antioxidant enzyme activity, a reactivation of glial cells in brain, and overexpression both GFAP and S100 β protein. Moreover, aluminum ions induce growth of the content of polypeptide fragments from these astrocyte-specific proteins caused by limited proteolysis in fish brain cells. Presented results showed evident fact on the development of typical astroglial reaction against chronic effect aluminum chloride in a brain of fishes from distinct pelagic areas.

Key words: hydrobionts, oxidative stress, neurospecific proteins, glial fibrillary acidic protein GFAP, S100 β .

Алюминий – самый распространенный в природе металл. Включая алюмосиликаты – соединения, составляющие примерно 82% массы земной коры, число минералов, в состав которых входит алюминий, превышает 250. Как один из наиболее распространенных элементов земной коры, алюминий содержится практически во всех природных водоемах, в состав которых он попадает различными путями: при частичном растворении глин и алюмосиликатов, с атмосферными осадками, сточными водами, с промышленными отходами [1].

В современной токсикологии повышенные концентрации ионов алюминия рассматриваются в качестве наиболее опасного из «скрытых» неблагоприятных факторов окружающей среды. Токсическое действие

алюминия связывают с его антагонизмом по отношению к кальцию, магнию, цинку, меди, а также его способностью накапливаться в тканях животных благодаря легкой интеграции в структуру белков. Степень аккумуляции алюминия в живых организмах ограничена нерастворимостью части его природных соединений в воде. Однако за счет того, что нерастворимые соединения алюминия солюбилизируются в кислой среде желудка позвоночных, содержание Al^{3+} в организме повышается. Повышенные концентрации алюминия в организме провоцируют развитие различных патологий, вызванных, главным образом, нарушением окислительно-восстановительного баланса тканей [2,3].

При избыточных концентрациях алюминия в организме гидробионтов органами-мишенями, как правило, являются почки, кости, центральная нервная система. Реакции нервной системы на интоксикацию алюминием довольно разнообразны. Нейротоксичность алюминия может сопровождаться нарушениями метаболизма глюкозы и механизмов сигнальной трансдукции [4]. Экспериментами с экспозицией *in vivo* и *in vitro* доказано, что алюминий влияет на процесс образования инозитолфосфата. Некоторые компоненты инозитолфосфатной сигнальной системы, в том числе белки (фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза C, протеинкиназа C, G-белок), чрезвычайно чувствительны к содержанию ионов алюминия, которые ингибируют гидролиз фосфоинозитола, что приводит к уменьшению уровня инозитолтрифосфата (ИРЗ) и высвобождению ионов Ca^{2+} из внутриклеточных мембранных систем [5]. Особую токсичность алюминия связывают со способностью рыб к интенсивному выделению слизи и аккумуляцией ионов этого металла в жабрах. При этом действие алюминия на функции жабр молоди рыб и мальков дифференцировано. Наиболее высокая чувствительность выявлена у мальков лосося, что может быть опосредовано недостаточно высокой активностью антиоксидантной защиты рыб в ранний период онтогенеза [6,7]. Несмотря на распространенность алюминия в водной среде, эффекты интоксикации алюминием гидробионтов изучены недостаточно. К тому же, антропогенное загрязнение водных ресурсов соединениями, приводящими к снижению кислотности среды, создает благоприятные условия для хронического роста содержания алюминия. Таким образом, исследования биологических эффектов ионов алюминия на популяции водных организмов являются актуальными, прежде всего для промышленных регионов с развитыми отраслями электротехнической, авиационной, химической, нефтеперерабатывающей промышленности. Рыбы, как последнее звено в трофической цепи водоемов, служат надежным и адекватным индикатором степени антропогенной нагрузки на водные экосистемы. Это обусловлено их высокой чувствительностью, широким распространением, доступностью для изучения реакций организма на различные внешние воздействия.

Для исследования хронического воздействия (в течение 45 суток) повышенных концентраций (10 мг/л) хлорида алюминия использовали по 20 взрослых половозрелых особей солнечного окуня, карася, плотвы обыкновенной, бычка-песочника, а также 60 особей солнечного окуня различного возраста – неполовозрелые (6-7 месяцев, n=20), молодые половозрелые (2-3 года, n=20) и взрослые (старше 5 лет, n=20), которые случайным образом были разделены на равные группы (контрольная и экспериментальная). Экспериментальные группы рыб содержали в одинаковых аквариумах емкостью по 180 литров. Контрольные группы солнечного окуня, карася, плотвы обыкновенной и бычка-песочника содержались в аквариумах с очищенной водопроводной водой. Все экземпляры рыб подвергались полному биологическому анализу. Несмотря на то, что анатомо-морфологический анализ экспериментальных и контрольных групп рыб не выявил уродств и отклонений от нормального развития, при исследовании интенсивности оксидативного стресса в печени и головном мозге особей экспериментальных групп бычка-песочника, карася и плотвы обыкновенной установлено, что содержание ТБК-активных продуктов достоверно повышено. Количество ТБК-активных продуктов в печени особей экспериментальных групп по сравнению с группами рыб, содержащихся в чистой водопроводной воде, было выше на 22-69% (см. рис. 1).

Рост количества конечных продуктов ПОЛ в печени взрослых половозрелых особей, обитающих в условиях алюминиевого загрязнения, был значительно ниже роста аналогичных показателей в головном мозге этих животных, где уровень содержания продуктов деградации липидов достоверно ($P < 0,01$) превышал контрольные значения на 41-58% (см. рис. 2).

Максимальный рост содержания конечных продуктов ПОЛ в головном мозге взрослых половозрелых животных при хроническом воздействии ионов Al^{3+} выявлен у особей плотвы обыкновенной (в среднем на 58% выше контрольных значений), несколько ниже показатели оксидативного стресса наблюдались в мозге взрослых половозрелых особей экспериментальных групп карася (в среднем 51%), солнечного окуня (в среднем 40,9%) и бычка-песочника (в среднем 40,5%). В печени взрослых половозрелых особей экспериментальных групп карася, бычка-песочника, солнечного окуня генерация оксидативного стресса относительно контрольных групп рыб была менее интенсивной по сравнению с головным мозгом – в среднем 35%, 22%, 26% ($P < 0,05$) соответственно. Исключение составили особи экспериментальной группы плотвы обыкновенной, у которых интенсивность оксидативных процессов в печени возросла в среднем на 69% ($P < 0,01$), и была сопоставима с интенсивностью этих процессов в головном мозге экспериментальных животных. Показатели активности ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы подтверждают более высокий уровень антиоксидантной защиты клеток печени по сравнению с клетками головного мозга.

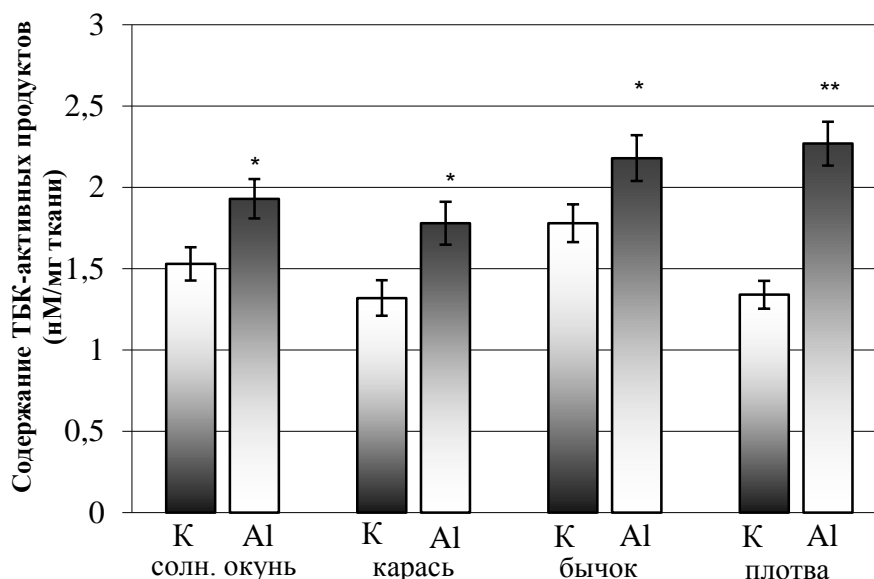


Рисунок 1 – Содержание конечных продуктов ПОЛ в печени взрослых половозрелых особей солнечного окуня, карася, бычка-песочника и плотвы обыкновенной в условиях хронического загрязнения ионами алюминия (Al) по сравнению с контрольными группами рыб (К); * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ – достоверность разницы в сравнении с контролем

Результаты исследований позволяют утверждать, что именно нервная ткань рыб, вследствие значительного содержания полиненасыщенных жирных кислот и высокого уровня утилизации кислорода (примерно 1/5 общего потребления), наиболее подвержена окислительному воздействию, поэтому окислительные повреждения ткани этого типа могут рассматриваться в качестве наиболее вероятного механизма реализации токсичных эффектов ионов алюминия.

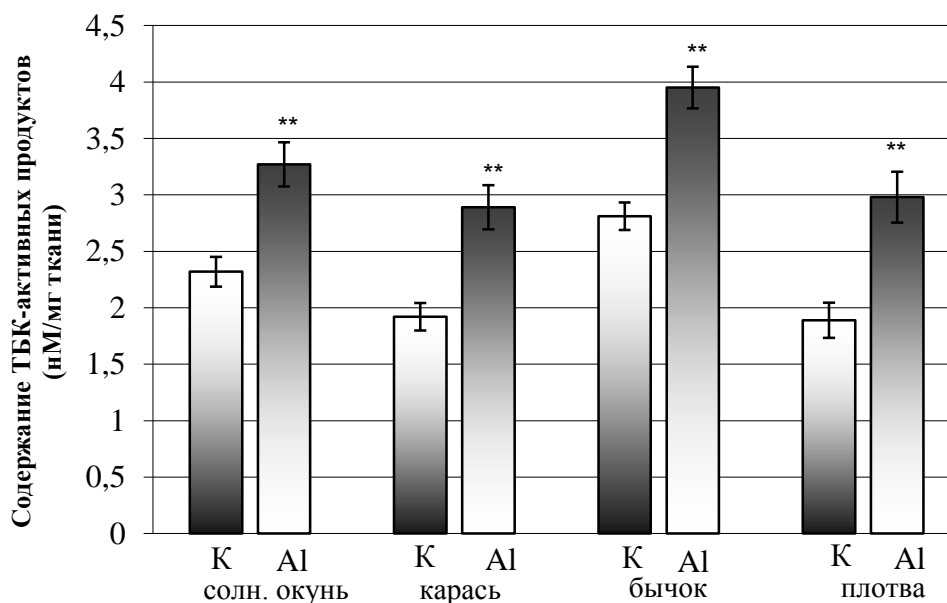


Рисунок 2 – Содержание конечных продуктов ПОЛ в мозге взрослых половозрелых особей солнечного окуня, карася, бычка-песочника и плотвы обыкновенной в условиях хронического загрязнения ионами алюминия (Al) по сравнению с контрольными группами рыб (К); ** – $P < 0,01$ – достоверность разницы в сравнении с контролем

В ходе количественного определения глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в мозге неполовозрелых, молодых половозрелых, взрослых особей солнечного окуня при воздействии Al^{3+} выявлено достоверное увеличение экспрессии данного астроглиального маркера у особей рыб всех возрастных групп (см. рис. 3).

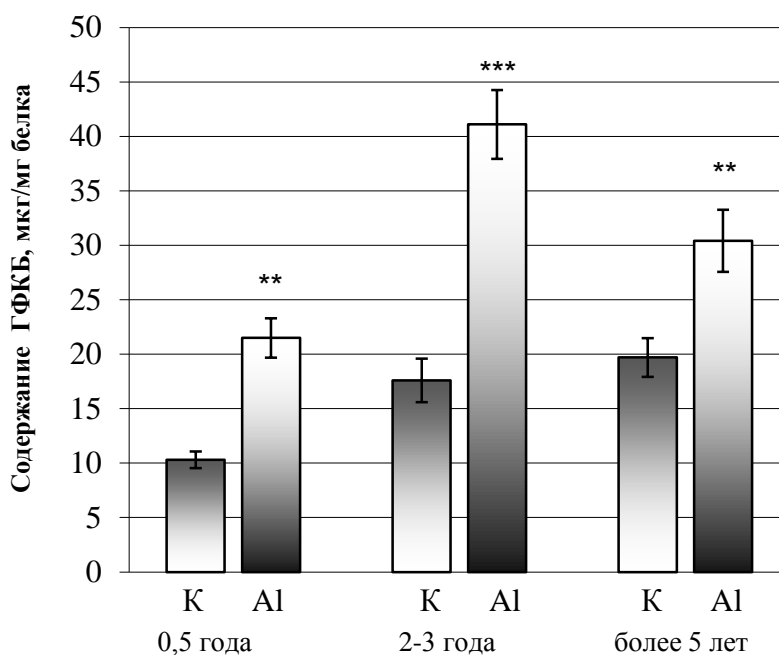


Рисунок 3 – Содержание ГФКБ в головном мозге солнечного окуня различных возрастных групп при хроническом воздействии алюминия (Al) по сравнению с контрольными группами рыб (К); ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – достоверность отличий в сравнении с контролем

В экспериментальных группах неполовозрелых и молодых половозрелых особей солнечного окуня экспрессия ГФКБ была выше контрольных значений на 112% ($P < 0,01$) и 131% ($P < 0,001$) соответственно. В группе рыб старше 5 лет ионы алюминия индуцировали возрастание содержания ГФКБ на 42% ($P < 0,01$). Такой рост экспрессии белка указывает на возрастные особенности астроглиальной реактивации в ответ на действие ионов алюминия. Возрастание экспрессии белка промежуточных фиалментов глии, сопровождается появлением деградированных полипептидных фрагментов ГФКБ. Такие дериваты могут быть идентифицированы с помощью иммуноблоттинга при условии, что их антигенные детерминанты сохраняются в нативном состоянии. Сравнительный анализ состава полипептидных фрагментов ГФКБ показал значительное увеличение содержания продуктов протеолитической деградации интактной субъединицы 49 кДа во всех возрастных группах. Выявленные различия свидетельствуют об индукции ионами алюминия интенсивных процессов реорганизации цитоскелета астроцитов нервной ткани особей солнечного окуня всех возрастных групп. Рост экспрессии астроглиального маркера – ГФКБ при воздействии повышенных концентраций Al^{3+} выявлен также и у взрослых половозрелых особей рыб разных видов (солнечного окуня, бычка-песочника, карася, плотвы обыкновенной). Установлено, что хроническое действие ионов алюминия индуцировало достоверное ($P < 0,01$) увеличение содержания ГФКБ в головном мозге взрослых половозрелых особей экспериментальных групп карася, бычка-песочника, солнечного окуня и плотвы обыкновенной по сравнению с контролем в среднем на 75%, 83%, 85% и 112% соответственно. Возрастание экспрессии ГФКБ сопровождается появлением деградированных полипептидных фрагментов этого белка. Наиболее характерные результаты иммуноблоттинга цитоскелетных фракций белков головного мозга особей контрольных и экспериментальных групп рыб представлены на рисунке 4.

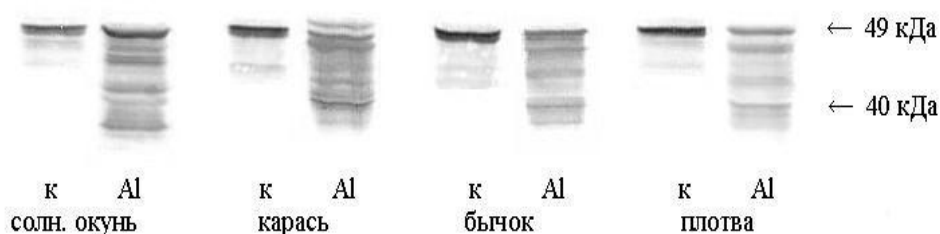


Рисунок 4 – Иммуноблоттинг цитоскелетных фракций белков головного мозга особей солнечного окуня, карася, бычка-песочника, плотвы обыкновенной, обитающих в условиях хронического воздействия алюминия (Al); К – контрольные группы рыб

Сравнительный анализ водорастворимой и цитоскелетной фракций ГФКБ экспериментальной и контрольной групп показал, что нерастворимые субъединицы этого белка, входящие в состав цитоскелетных структур, подвергаются протеолитической деградации в большей степени. Таким образом, ионы Al^{3+} индуцируют

в нервной ткани разного возраста рыб всех исследуемых видов не только характерный реактивный ответ астроцитов на метаболические нарушения, но и активируют деградацию молекулярных компонентов цитоскелета.

Миграция ГФКБ-положительных клеток во многом зависит от поступления в клетку Ca^{2+} , регуляция внутриклеточной концентрации которого осуществляется с помощью универсальных для всех типов клеток кальций-связывающих белков. Одним из представителей таких белков является нейроспецифический протеин S100 β , синтезирующийся преимущественно клетками нейроглии. Выявлено, что продолжительное воздействие хлорида алюминия индуцирует достоверное увеличение содержания цитозольного белка головного мозга рыб S100 β . Сравнительный анализ результатов иммуноблотинга, позволяющий оценить различия в содержании протеина S100 β в мозге взрослых половозрелых особей солнечного окуня и карася экспериментальных и контрольных групп, дает основания утверждать о достоверном увеличении содержания полипептидов с молекулярной массой от 24 до 37 кДа (см. рис. 5).



Рисунок 5 – Иммуноблотинг цитозольных фракций белков головного мозга взрослых половозрелых особей солнечного окуня и карася, обитающих в условиях хронического воздействия алюминия (Al); к – контрольные группы рыб

Относительное содержание этого белка было достоверно повышенным в мозге взрослых половозрелых особей экспериментальных групп – солнечного окуня (в среднем на 105%, $P < 0,05$) и карася (в среднем на 67%, $P < 0,01$) относительно аналогичных показателей в головном мозге контрольных групп рыб тех же видов. Из полученных результатов исследований следует, что интоксикация алюминием вызывает ответные молекулярные перестройки клеток астроглии нервной ткани, в ходе которых увеличение синтеза цитоскелетного ГФКБ сопровождается достоверным увеличением содержания цитозольного кальций-связывающего протеина S100 β и его дериватов с $M_r=24-37$ кДа.

Представленные результаты токсичности ионов алюминия для клеток нервной ткани рыб полностью согласуются с современными представлениями о его потенциальной нейротоксичности для широкого круга организмов [4-6]. Показано, что в нервной ткани рыб различных пелагических зон оксидативный стресс тесно ассоциирован с развитием реактивного астроглиоза. В мозге рыб разных видов ионы алюминия вызывают экспрессию ГФКБ и протеина S100 β , пролиферацию и дифференциацию астроцитов. Наиболее интенсивная астроглиальная реактивация выявлена в мозге особей половозрелых рыб. В то же время, повышение содержания конечных продуктов ПОЛ в головном мозге особей этой экспериментальной группы было ниже, чем в других возрастных группах. Полученные результаты указывают на важную роль астроцитов в защите нервной ткани при интоксикации. Выявленные возрастные различия интенсивности астроглиоза указывают на наиболее высокий уровень адаптивного потенциала у молодых половозрелых особей и более выраженную способность астроцитов к пролиферации в мозге рыб в первой половине онтогенеза.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что воздействие ионов алюминия на нервную ткань рыб различных пелагических зон индуцирует возникновение оксидативного стресса. Как следствие оксидативных нарушений в нервной ткани, реализуется клеточный ответ – реактивация астроцитов, которая сопровождается молекулярными перестройками, ведущими к повышению экспрессии астроцит-специфических белков – ГФКБ и протеина S100 β . Увеличение синтеза цитоскелетного ГФКБ тесно ассоциировано с достоверным увеличением содержания цитозольного кальций-связывающего протеина S100 β и его дериватов. Комплексное определение показателей астроглиоза (содержание ГФКБ, S100 β) и оксидативного стресса в условиях действия ионов алюминия может использоваться в качестве валидных биомаркеров для характеристики состояния рыб различных пелагических зон в процессе онтогенеза.

Список литературы / References:

1. Сирина Н.В. Оценка воздействия на атмосферный воздух предприятий алюминиевой промышленности. *Известия Иркутского государственного университета*, 2008, № 1, с. 181-188. [Sirina N.V. Impact evaluation of enterprises of the aluminum industry on atmospheric air. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2008, no. 1, pp. 181-188. (In Russ.)]
2. Новицкий Р.А., Сухаренко Е.В., Недзвецкий В.С. Молекулярные биомаркеры эффектов ионов Al^{3+} на генерацию оксидативного стресса и клеточную реактивацию в организме *Lepomis gibbosus* (Pisces: Centrarchidae). *Гидробиол. Журнал*, 2013, № 6 (49), с. 65-75. [Novitskiy R.A., Suharenko E.V., Nedzvetskiy V.S. Molecular biomarkers

of Al³⁺ ions effect on oxidative stress generation and cellular reactivation in a fish *Lepomis gibbosus* (Pisces: Centrarchidae). *Gidrobiol. Zhurnal*, 2013, no. 6 (49), pp. 65-75. (In Russ.)]

3. Недзвецкий В.С., Сухаренко Е.В., Неруш О.П. Биологическая и социальная значимость использования молекулярных компонентов с целью определения метаболических нарушений, вызванных ионами алюминия. *Ученые записки Российского государственного социального университета*, 2011, № 4, с. 192-196. [Nedzvetskiy V.S., Suharenko E.V., Nerush O.P. Biological and social importance of apply to the molecular components for purpose of determining metabolic disturbances induced by aluminum ions. *Uchenyie zapiski Rossiyskogo gosudarstvennogo sotsialnogo universiteta*, 2011, no. 4, с. 192-196. (In Russ.)]

4. Kaneko N., Yasui H., Takada J. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J. Inorg. Biochem*, 2004, vol. 12, no. 98, pp. 2022-2031.

5. Nday C.M., Drever B.D., Salifoglou T., Platt B. Aluminium interferes with hippocampal calcium signaling in a species-specific manner. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2010, vol. 104, pp. 919-927.

6. Skilbrei O.T., Finstad B., Urdal K. Impact of early salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, infestation and differences in survival and marine growth of sea-ranched Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolts 1997-2009. *Journal of fish diseases*, 2013, vol. 3, no. 36, pp. 249-260.

7. Сухаренко Е.В., Недзвецкий В.С., Максимов В.И. Эффекты ионов алюминия на состояние нервной ткани солнечного окуня в различные сроки онтогенеза. Вестник АПК Ставрополя, 2015, № 1 (17), с. 119-125. [Suharenko E.V., Nedzvetskiy V.S., Maksimov V.I. Effect of aluminum ions on a state of nervous tissue of a sun fish at various ontogenetic ages. *Vestnik APK Stavropolya*, 2015, no. 1 (17), pp. 119-125. (In Russ.)]

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ (РАЗВЕДЕНИЙ) БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МЕХАНИЗМ И ВЕКТОР ИХ ЭФФЕКТОВ

Алексеева О.М.¹, Кременцова А.В.¹, Голощапов А.Н.¹, Ким Ю.А.²
¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ
e-mail: olgavek@yandex.ru
²ФГБУН Институт Биофизики клетки РАН
г. Пущино, РФ

Аннотация. Обсуждается изменение вектора воздействия биологически активных веществ (БАВ) на биообъекты в зависимости концентрации БАВ. Механизм действия БАВ на структуру и функции биообъектов также в значительной степени зависит от концентрации применяемого вещества. В случае с гидрофильным мелафеном (регулятором роста растений) наблюдали изменения термодинамических параметров фосфолипидных мультиламеллярных липосом, что свидетельствует о разном влиянии варьируемых концентраций мелафена на организацию липидных микродоменов в структуре однородной мембраны. При исследовании влияния на функции было обнаружено изменение вектора воздействия на кальциевую сигнализацию в клетках асцитной карциномы Эрлиха в зависимости от концентрации мелафена. В случае с гидрофобным ИХФАН-С10 (поплавковый гибридный антиоксидант-ингибитор холинэстераз, встраивающийся в гидрофильную и гидрофобную фазы мембран) водные эмульсии при значительных разведениях меняют механизм воздействия, от неспецифического разрушения мембраны до укрепления структуры мембраны. Необходимо указать, что в случае БАВ – мелафена и ИХФАН-С10, разные концентрации достигались последовательными разведениями при интенсивном перемешивании и не были подтверждены физико-химическими методами. Поэтому целесообразно говорить о разведениях. Сделан вывод о том, что необходимо учитывать при воздействии на биообъекты БАВ в широком диапазоне концентраций (разведений) зависимость механизма действия от степени разведения БАВ.

Ключевые слова: Биологически активные вещества, мелафен, ИХФАН-С10, мультиламеллярные липосомы, ДСК, асцитная карцинома Эрлиха, метаболические пути, Ca²⁺-сигнализация.