УДК 577.112.5/ 632.95 https://doi.org/10.31867/2786-6750.1.1.2022.130-140

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ МІДЬ-ВМІСТНИХ ПЕСТИЦИДІВ

В. С. Недзвецький, Д. М. Масюк
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. С. Єфремова, 25, м. Дніпро, 49000, Україна

Незважаючи на добре відомий факт, що іони міді є високотоксичними для гідробіонтів, мідний купорос залишається одним із поширених пестицидів у вирощувані риби. Висока цитотоксичність і накопичення іонів міді в осадах потребують вивчення та розрахунку оптимального дозування для використання його як антисептичного засобу. Основним механізмом, який супроводжується токсичною дією іонів міді, є генерація окисного стресу. Клітини нервової тканини надзвичайно чутливі до окислювальних пошкоджень, а функції ЦНС мають вирішальне значення для організму.

Дослідження впливу іонів міді на клітини нервової тканини є принципово важливими для оцінки цитотоксичності пестицидів. Гліальні клітини підтримують структуру і багато життєво важливих функцій нейронів. Гліальний фібрилярний кислий білок цитоскелету (GFAP), транскрипційний ядерний фактор легкого каппа-ланцюга активованих В-клітин (NF-kB) і полі-(АДФ-рибозо)-полімераза (PARP) є критичними учасниками клітинної відповіді на різні токсичні впливи.

Вивчали вплив іонів міді на експресію PARP, NF-kB та GFAP у тканині мозку райдужної форелі (Rainbow trout). Протягом 96 годин риби піддавалися впливу сублетальної концентрацій мідного купоросу (380 мкг/л). Вестерн-блот-аналіз GFAP і PARP використовувався для оцінки подальших ефектів у тканині мозку. Загалом, усі досліджувані дози міді значно знижували експресію GFAP. Однак, збільшення вмісту GFAP було виявлене за умов експозиції міді протягом 24 години. Крім того, експозиція мідним купоросом викликала в мозку риб незначну втрату вміста β-актину, особливо в групі 96-годинної експозиції.

Отримані результати продемонстрували значне порушення експресії транскрипційного фактора NF-kB в головному мозку груп риб під впливом міді. Виявлені зміни показали дозозалежний ефект сублетальної дози мідного купоросу. Однак вплив низьких доз іонів міді не показав ефекту в групі риб, які отримували лікування протягом 24 годин. Порівняльний аналіз вмісту PARP в мозку риб, які піддалися впливу міді, показав залежність цитотоксичної дії в залежності від тривалості впливу у межах 24 – 96 годин. Таким чином, сублетальні дози міді можуть пригнічувати експресію PARP залежно від часу. Результати показали, що іони міді можуть викликати астрогліальну відповідь, що супроводжується модуляцією експресії NF-kB і PARP-1. Отримані дані свідчать про значний вплив мідного купоросу на астрогліоз і репарацію пошкоджень ДНК в мозку риб.

Ключові слова: *райдужна форель, цитоскелет, транскрипційні фактори, гліальні клітини, цитотоксичність.*

Мідь вважається одним із найпоширеніших важких металів антропогенного походження в прісноводних екосистемах у всьому світі, так само, як і розповсюдженим токсичним забруднювачем. Разом, сільське господарство та промислові підприємства є основними джерелами забруднення навколишнього середовища різними сполуками міді [1].

Прогресивний розвиток сільськогосподарського виробництва призвів до зростання кількості прісноводних систем, які піддаються впливу різних токсичних забруднювачів, включаючи класичні застарілі пестициди. Токсичні забруднювачі можуть легко потрапляти в річки та озера з незначними потоками стічних вод. Мідний купорос ($CuSO_4$) використовується повсюдно як засіб проти грибкової та протозойної інфекції в сільському господарстві. Іони міді виявляють у водних екосистемах, як у межах концентрацій нетоксичного допустимого рівня, так і у концентраціях, які перевищують такий рівень.

Продукція аквакультури займає значну частку виробництва харчового споживан-

Інформація про авторів:
Недзвецький Віктор Станіславович, *доктор біолог. наук, професор,* e-mail nedzvetskyvictor@ukr.net, https://orcid.org/0000-0001-7352-441X
Масюк Дмитро Миколайович, *доктор вет. наук, професор, заст. декана,* e-mail dimasiuk@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-2800-2580

ня у всьому світі та супроводжується прогресом у застосуванні пестицидів. Безпека харчових продуктів та екологічна стійкість у промислово розвинених країнах є однією з головних проблем сучасного світу. Системи вирощування риби перетворюють з невеликих екстенсивних ставків до інтенсивних водойм з високою щільністю посадки і використанням пестицидів для боротьби з хворобами риб.

Широка антисептична дія сполук міді дозволяє використовувати її як доступний неспецифічний фунгіцид, акарицид та анисептик у різних підприємствах аквакультури та сільського господарства. Пестициди, що містять Cu^{2+}, застосовуються для очищення води від водоростей, особливо в креветкових ставках для видалення ниткоподібних водоростей. Крім того, $CuSO_4$ може інактивувати кілька токсичних метаболітів ціанобактерій, включаючи геосмін і 2-метилізоборнеол. Лікування деяких широко поширених прісноводних паразитів $CuSO_4$, Ichtyophthirius multifiliis, вимагає високих концентрацій цієї хімічної речовини, які рекомендовані як мінімальна доза 50 мкг/л [2].

Сульфат міді є найдешевшим пестицидом у всьому світі, тому він займає лідируючі позиції серед засобів для захисту риб від мікробних і найпростіших зовнішніх паразитів в інтенсивному рибництві. Крім того, мідний купорос широко використовується в галузі аквакультури як ефективний засіб для профілактики та лікування різних ектопаразитарних та бактеріальних інфекцій [3]. Використання мідного купоросу є ефективним способом зниження захворюваності різними паразитами риб, включаючи гриби, найпростіші та нематоди. Іони міді ефективно пригнічують ріст кількох типів бактерій, включаючи Salmonella spp., Pasteurella spp., Vibrio spp. тощо. В той же час, тривале використання сполук міді сприяє значному накопиченню цього токсичного елемента у водних екосистемах. Концентрація міді у воді ставка залишається на токсичному рівні щонайменше через 50 годин після одноразової обробки і також може пригнічувати ріст риби. Крім того, риби можуть накопичувати мідь, як це було продемонстровано на фермі сомів у В'єтнамі [4].

Значне число досліджень продемонстрували шкідливий вплив мідного купоросу, який супроводжувався антисептичним пригніченням інфекцій у різних видах промислових риб. Нещодавно показано, що підвищені рівні міді можуть ініціювати різні клітинні порушення, ушкодження міжклітинних контактів, порушення регуляції сигнальних шляхів і життєздатності клітин риб. На додаток, вплив міді може викликати окислювальний стрес і апоптоз у зябрах риб [5]. Незважаючи на добре вивчену токсичність іонів міді, цитотоксичні ефекти різних доз міді в мозок риб залишаються невідомими, так само, як і безпечне дозування цього пестициду для рибництва. З огляду на це, пошук молекулярних маркерів для оцінки цитотоксичності є надзвичайно важливим. Специфічні для нервової тканини білки можуть бути перспективним інструментом для визначення нейротоксичності. Гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) був вперше виділений і охарактеризований як нервовоспецифічний компонент цитоскелету гліальних клітин [6]. GFAP є основним компонентом проміжних філаментів астроцитів та епендимальних клітин. GFAP є найбільш взнаним маркером астроцитів та їх реактивації, спричиненої різними чинниками. Проміжні філаменти астроцитів беруть участь у широкому спектрі важливих процесів у центральній нервовій системі, включаючи відповідь клітин на токсичні агенти тафункціонування гематоенцефалічного бар'єру [7]. GFAP залучається до процесів відновлення різних пошкоджень клітин нервової системи. Роль GFAP у відновленні ушкоджень виявлена в усіх ділянках нервової ситеми де присутні астроцити.

Іншим перспективним молекулярним маркером є транскрипційний фактор NF-kB. Передача сигналів, опосередкована NF-kB, є одним з універсальних механізмів регуляції реакції клітин у різних типах тканин. Вплив міді на життєво важливі сигнальні шляхи може переключати долю клітини через активацію програмованої клітинної загибелі. Показано, що надмірна активація NF-kB внаслідок дії сполук міді індукує клітинну відповідь у культурі клітин [8].

Кожен тип клітин потребує механізмів відновлення ДНК під час генотоксичних ефектів, викликаних забруднювачами навколишнього середовища. Полі-[АДФ-рибоза]

полімераза (PARP) відіграє важливу роль у репарації пошкодженої ДНК і бере участь у регуляції клітинної відповіді на різні токсичні фактори. Крім того, PARP може регулювати декілька критичних факторів транскрипції, включаючи NF-kB, p53 і AP-1, які беруть участь у клітинній відповіді та реактивності клітин під впливом зовнішніх токсичних факторів. Нажаль, роль вищезазначених білків у механізмах нейротоксичності міді залишається не дослідженою. Враховуючи, що багато рибних господарств продовжують інтенсивно використовувати мідний купорос як пестицид, дослідження молекулярних механізмів нейротоксичності міді необхідне для з'ясування його потенціалу для модуляції клітинної реактивності в мозку прісноводних риб. Райдужна форель є однією з загальновизнаних моделей екотоксичних досліджень, зокрема токсичності іонів важких металів [9].

Мета досліджень. Встановити роль молекулярних маркерів гліального цитоскелету та регуляції транскрипції в нервовій тканині райдужної форелі за умов цитотоксичної дії іонів міді.

Матеріал та методи досліджень. У дослідженні були використані 20 осіб райдужної форели (Oncorhynchus mykiss) (118 ± 11 г) які були отримані у фермерському господарстві «Кебан», м. Елазиг, Туреччина. Відібрані риби були розміщені для адаптації в акваріумах з склопластику об'ємом 400 л протягом 2 тижнів. Для визначення дозозалежної токсичної дії іонів міді (LC50) використовували експозицію концентрацій: 500, 1000, 1500, 2000 і 3000 мкг/л протягом 96 годин. Визначення смертності дозволило розрахувати значення LC50 як 1520 мкг/л. На основі визначеного значення LC50 було обрано дозу, які відповідала 25% LC50 (0,380 мкг/мл). Вплив цієї дози проводили у 3-х експериментальних групах з різним часом експозиції (24, 48 і 96 години). Контрольна і усі експериментальні групи були сформувані з п'яти осіб кожна. Процедури проведення експерименту та експозиції проводилися відповідно до Протоколу експерименту, затвердженого Комітетом з етики експериментів на тваринах Університету Бінгьоль.

Зразки білкових екстрактів отримували шляхом гомогенізації тканини мозку у 25 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4), що містив 0,2 % додецилсульфату натрія та коктейль інгибіторів протеаз та наступного центрифугування як це описано раніше [10]. Концентрацію білка в кожному зразку білкових екстрактів визначали за методом Бредфорда. Зразки змішували у співвідношенні 1:1 з буфером для зразків Леммлі, що містить 0,1 М дитіотреїтолу, і кип'ятили протягом 5 хв. Зразки білка заморожували при -20°C і зберігали перед аналізом не більше двох тижнів.

Визначення вмісту GFAP, NF-kB та PAPR-1 проводили методом імуноблотингу як це описано раніше (Nedzvetsky et al., 2019). В роботі використовували антитіла - анти-PAPR-1 (Abcam, ab-194586), анти-NF-kB p65 (Abcam, кат. № ab-16502), анти-GFAP (Santa-Cruz, sc-9065) або анти-β-актин (Santa-Cruz, sc-69879) антитіла, розведені 1/2000. Денситометричний аналіз отриманих результатів проводили з використанням софту Total Lab TL120. Молекулярні маси забарвлених поліпептидних зон були ідентифіковані шляхом екстраполяції відносної рухливості кожного поліпептиду на ділянці попередньо забарвлених білків з відомою молекулярною масою (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Німеччина).

Визначення активних форм кисню. Реактивні сполуки кисню (РСК) у мозку риб визначали флуоресцентим методом. Свіжі ви-ділені зразки тканини мозку окремо від кожної риби гомогенізували в буфері Tris-HCl (50 мМ, pH=7,4) на льоду у співвідношенні 1:10 в/об. Зразки гомогенату мозкової тканини об'ємом 100 мкл змішували з 1 мл того ж буфера та 5 мкл 10 мкМ діацетату 2′,7′-дихлорфлуоресцеїну (DCFDA). Отримані суміші інкубували при 37°C протягом 30 хв. (інкубатор Lab. Companion SI-600, Jelio Tech., Корея). Після інкубації інтенсивність флуоресценції вимірювали у зразках за допомогою флуоресцентного спектрофотометра LS55 (PerkinElmer, США) із збудженням λ=485 нм та випромінюванням λ=525 нм.

Статистичний аналіз. Дані щодо вмісту білка виражають у відсотках щодо контрольної групи та представлені як середнє ± стандартне відхилення (SD) на гістограмах. Кількісні результати аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим тестом Бонферроні

post-hoc. Значення P<0,05 було визначене як статистично значуще.

Результати досліджень. Результати вимірювання GFAP в головному мозку риб контрольної групи та груп, які зазнали впливу мідного купоросу, показали зміни вмісту цього білка цитоскелету як результат цитотоксичності іонів міді. Більш короткочасна експозиція (24 години) викликала зростання відносного вмісту GFAP. В той же час, більш тривалі експозиції (48 та 72 години) індукували зниження GFAP (Рис. 1).

Отримані результати змін вмісту GFAP в мозку риб може бути індукований неспецифічними множинними порушеннями метаболізму та цитотоксичними ефектами іонів міді у нервовій тканині.

Результати визначення вмісту NF-kB у мозку риб за умов впливу іонів міді показали значну чутливість цього транскрипційного фактору до токсичного ефекту міді. В усіх експериментальних групах було виявлене зростання вмісту NF-kB у порівнянні з контрольною групою риб. В той же час, підвищення вмісту NF-kB у групі риб, які були експоновані токсичним впливом мідного купоросу 24 години, визначене як статистично недостовірне (Рис. 2).

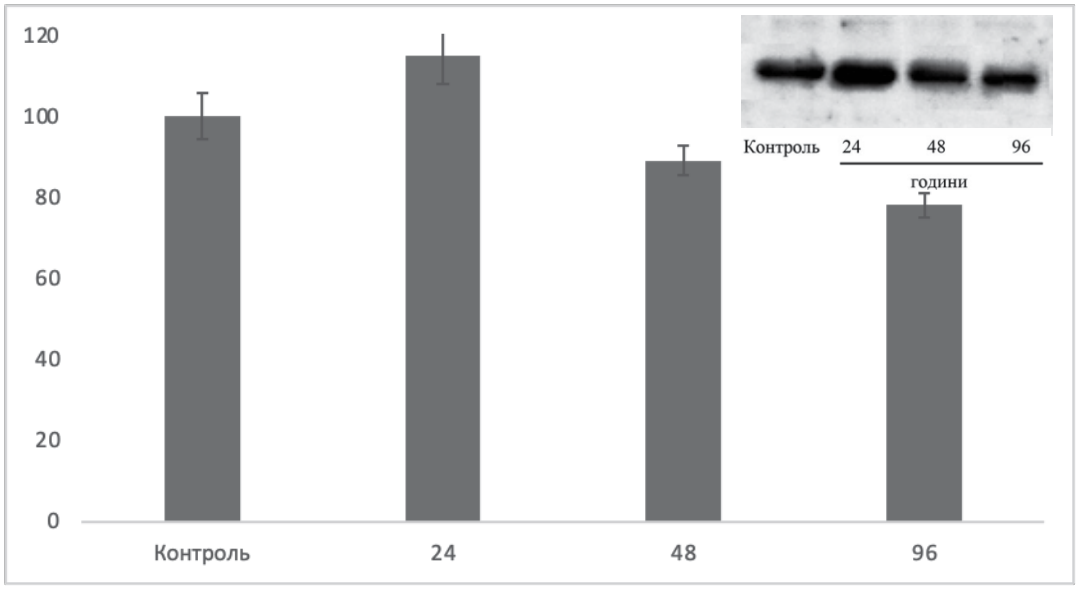


Рис. 1. Відносний вміст GFAP у мозку райдужної форелі контрольної та експериментальних груп експонованих 24, 48 та 96 годин розчином мідного купоросу у дозі 380 мкг/л.

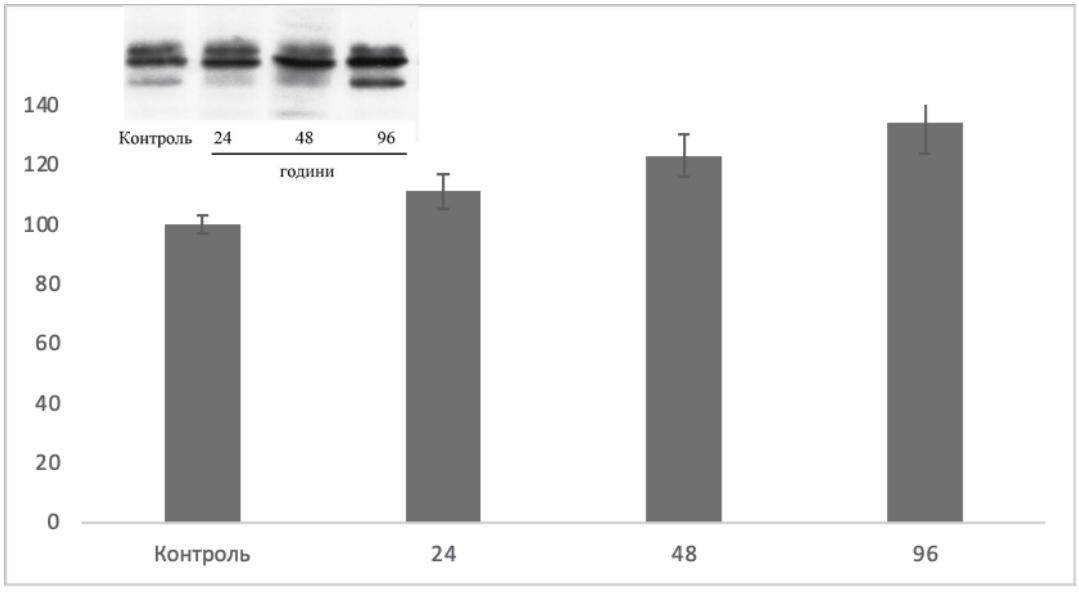


Рис. 2. Відносний вміст NF-kB у мозку райдужної форелі контрольної та експериментальних груп експонованих 24, 48 та 96 годин розчином мідного купоросу у дозі 380 мкг/л.

На відміну від результатів отриманих в ході визначення вмісту GFAP та NF-kB, зміни вмісту PARP в мозку експериментальних груп риб, що були експоновані сублетальної дозою мідного купоросу, було виявлене зменшення вмісту PARP у порівнянні з контролем (Рис. 3).

Слід відмітити дозозалежний харак-

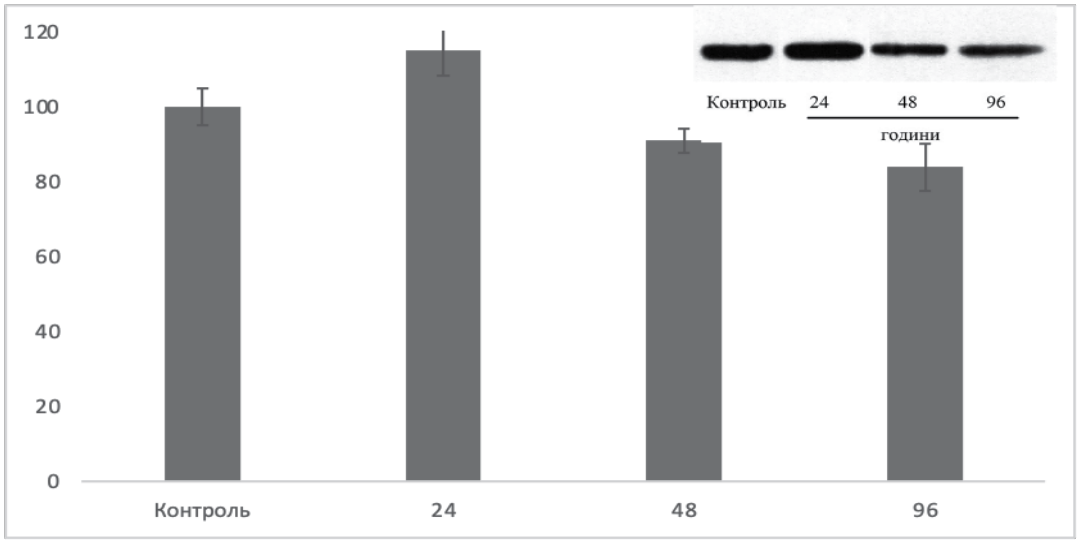


Рис. 3. Відносний вміст PARP-1 у мозку райдужної форелі контрольної та експериментальних груп експонованих 24, 48 та 96 годин розчином мідного купоросу у дозі 380 мкг/л.

тер пригніченя вмісту PARP в мозку риб за умов впливу іонів міді. Таким чином, отримані результати підтверджують припущення, що іони міді в дозі 380 мкг/л можуть модулювати експресію PARP залежно від часу.

Загалом, представлені результати свідчать про те, що сублетальні дози міді можуть викликати в мозку риб комплексну дерегуляцію цитоскелету, транскрипційних регуляторів клітинної відповіді та PARP-залежної системи репарації ДНК ушкоджень.

Беручи до уваги, що токсичність металів супроводжується окислювальним стресом, який є однією з істотних причин, що ініціює гіперактивацію клітинної реакції, ми дослідили рівень РСК для визначення та підтвердження причинно-наслідкового зв'язку окисного стресу з індукцією цитотоксичності у мозку риб. Таким чином, у представленому дослідженні було визначено рівні РСК мозку у риб контрольної та експонованої груп, щоб оцінити іони міді як причину генерації окисного стресу. Отримані дані свідчать про виражений залежний від часу ефект міді у кожній групі риб, які отримували досліджувані дози мідного купоросу (Рис. 4).

Риби визнані зручним і адекватним таксоном гідробіонтів для біоіндикації забруднення важкими металами у водних екосистемах [11]. Однак дослідники переважно вивчають вміст важких металів та індекси окисного стресу в зябрах, печінці, статевих залозах та м'язах риб. В той же час, дані про цитотоксичність важких металів у мозку риб є вкрай обмеженими.

Мідь є важливим елементом харчування, і баланс рівня міді є критичним для життєво важливих метаболічних шляхі. Фізіологічна концентрація міді регулюється білково-зв'язуючою і білково-транспортною системами в тканинах, особливо в печінці, де вона становить 18–45 мкг/г сухої маси. Дефіцит міді зазвичай призводить дисбаланс м'язової активності, аномалій як крові, так і нервових клітин у людей. Більше того, нестача міді може спричинити дефекти вагітності, особливо розвиток мозку та серцево-судинні порушення, які спостерігалися на багатьох моделях тварин. Мідь є перехідним металом і широко поширеним неорганічним іоном в організмах усіх видів хребетних і безхребетних. Цей іон відіграє багато ролей в еукаріотичних клітинах. Незважаючи на важливе значення, надмірне збільшення рівня міді перетворює цей іон на токсичний агент. Здатність міді легко обмінюватися

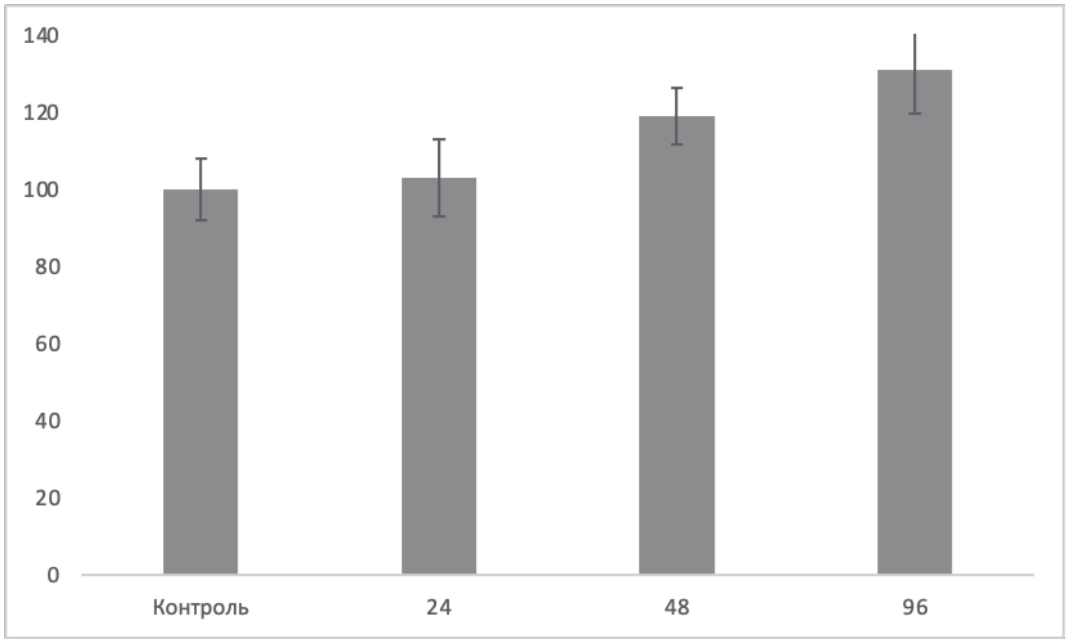


Рис. 4. Відносний вміст РСК у мозку райдужної форелі контрольної та експериментальних груп експонованих 24, 48 та 96 годин розчином мідного купоросу у дозі 380 мкг/л.

електронами робить її високореактивною, що призводить до цитотоксичності для еукаріотичних клітин і мікроорганізмів. Незважаючи на це, мідь надзвичайно важлива для ключових метаболічних функцій. Вплив підвищеного вмісту іонів міді може викликати ряд порушень у регуляції ключових шляхів. Мідь є важливим елементом, але високі концентрації розвивають цитотоксичність у багатьох видах живих організмів. Нещодавно було запропоновано фізіологічний механізм накопичення міді, що асоційований з підвищеним окислювальним стресом у печінці [12].

Крім того, вони продемонстрували докази того, що мідь може знижувати антиоксидантну здатність і бути критично небезпечною для популяції риб при підвищеній температурі.

Беручи до уваги вразливість клітин нервової тканини до окислювальних пошкоджень, отримані нами дані підтримують гіпотезу про тісний зв'язок між генерацією окисного стресу та відповіддю гліальних клітин на нейротоксичність міді. Індукований впливом міді посилення експресії GFAP, а також активності PARP і NF-kB може бути частинами реакції клітинного комплексу, спрямованої на виживання клітин мозку.

Крім того, ряд дослідників представили експериментальні дані, що свідчать про високі токсичні властивості міді для багатьох видів хребетних тварин. Цитотоксичність, спричинена міддю, тісно пов'язана з порушенням окислювально-відновного балансу та підвищенням окисного стресу. Вплив Cu^{2+} веде до загибелі клітин печінки миші, що супроводжуються посиленням ядерної конденсації, фрагментацією ДНК та мітохондріальною дисфункцією. Серйозні пошкодження клітин печінки даніо реріо були продемонстровані після впливу низької дози 5 мкМ Cu^{2+}. Більше того, іон міді зменшує потенціал мітохондріальної мембрани, активує каспазу-3 і розщеплення PARP, що разом може відображати активацію апоптозу [13]. Печінка є основним органом детоксикації ксенобіотиків, а також важливою мішенню цитотоксичності міді. Показано, що мідь інтенсивно транспортується до клітин печінки, що призвело до високої метаболічної активності печінкової тканини. Крім того, мідь накопичується в печінці завдяки високій спорідненості зв'язування в комплексі Cu^{2+}-металотіонеїн в гепатоцитах. Порушення функції печінки призводить до відсутності детоксикації та циркуляції токсичних метаболітів у крові. Однак, залишається відкритим питання токсичності міді у тканині моз-

ку. Клітини мозку дуже чутливі до цих токсичних речовин. Таким чином, токсичність міді може бути реалізована через її прямий вплив на клітини мозку, а також непрямий вплив, опосередкований пошкодженням гепатоцитів. Відомо, що окремі види риб, наприклад, сом (Clarias gariepinus), можуть накопичувати Cu^{2+} із забрудненого водного середовища [14]. За результатами досліджень, біоакумуляцію міді в печінці було визначено як набагато інтенсивнішу порівняно з зябрами, м'язами та шкірою. На жаль, даних про накопичення міді в мозку риб немає. Більше того, токсична дія Cu^{2+} на клітини нервової тканини досі не вивчена. Крім того, механізми цитотоксичності міді в нервовій тканині невідомі і вимагають інтегрального дослідження клітинної та молекулярної відповіді на вплив Cu^{2+}.

Порівняльний аналіз кадмію, хрому, цинку та міді цих перехідних металів показав, що найбільшу цитотоксичну дію мідь виявила в клітинах нирок білого амура (Ctenopharyngodon idellus) [15]. Цитотоксичні концентрації міді можуть викликати порушення, які призводять до окисних ушкоджень і розривів ланцюга ДНК. Показано, що іони міді інгібують відновлення пошкоджень ДНК, викликане метилметансульфонатом. Таким чином, екологічні джерела впливу міді можуть модулювати генотоксичний ефект, опосередкований іншими забруднювачами довкілля.

Одним із найбільш вивчених способів відновлення ДНК в еукаріотичних клітинах є синтез полі-рибози за допомогою універсального ферменту під назвою полі-[АДФ-рибоза]-полімераза 1 (PARP-1). Передбачається, що генотоксичність міді пов'язана з дерегуляцією PARP-1, особливо під час раннього розвитку.

Результати, отримані в нашому дослідженні, підтвердили значну дерегуляцію PARP-1 в мозку риби індуковану іонами міді. Порушення експресії PARP-1 може спричинити зміни АДФ-рибозилювання та синтезу полі-рибози, які відповідають за репарацію ДНК. АДФ-рибозилювання є одним із ключових регуляторів клітинних процесів, включаючи регуляцію динамічної перебудови хроматину, транскрипції, трансляції білка та конформаційної стабільності кінцевих продуктів. Ми виявили виражену дерегуляцію експресії PARP-1 в мозку райдужної форелі, яка була спричинена сублетальною дозою (380 мкг/л) іонів міді. Таким чином, токсичні ефекти міді можуть бути пов'язані з дерегуляцією PARP-1, як це було продемонстровано в нашому дослідженні.

Виявлені зміни вмісту GFAP в мозку риб експериментальних груп можуть бути опосередковані великим числом різних механізмів в гліальних клітинах, включаючи експресію та метаболізм цитоскелетних білків [8, 10]. Отримані результати свідчать про наявність у клітинах мозку риб складного механізму впливу різних доз міді на регуляцію GFAP. Біфуркаційний ефект міді свідчить про те, що цитотоксичність цього іону залежить від тривалості дії, а також, від реакції гліальних клітин на ушкодження. Експресія GFAP є найбільш часто використовуваним біомаркером астрогліальної реактивності [16]. Вміст GFAP причетний до структури та функцій клітинного цитоскелета. Реакція астроцитів на багато пошкоджень ЦНС називається реактивним гліозом або астрогліозом. Багато досліджень показали, що модуляція експресії GFAP змінює здатність астроцитів до проліферації та інші життєво важливі функції.

Астроцити є найбільш поширеною клітинною популяцією в мозку хребетних. Астрогліальні клітини забезпечують захист від токсичних ушкоджень і підтримують як структуру, так і функції нейронів. Реактивація астроцитів є однією з основних подій у захисних реакціях проти різних факторів ураження. У нашому дослідженні виявлений цитотоксичний ефект міді суапроводжується порушенням гліального цитоскелету шляхом змін рівню експресії GFAP в мозку риб. Різна тривалість впливу міді викликала різноспрямовані зміни. Ці результати можуть відображати дозозалежну динаміку реактивності астроцитів як відповідь на цитотоксичність міді. Таким чином, захисний ефект астрогліозу розвивається як нелінійна функція і залежить як від інтенсивності подразника, так і від його тривалості.

Механізми регуляції експресії GFAP в мозку риби та дозозалежна реактивність астроцитів залишаються невідомими. Модуляція вмісту GFAP в астроцитах з експозицією

міді залежить як від активності експресії, так і від інтенсивності розщеплення протеазами. Багато даних підтверджують докази того, що GFAP та його протеолітичні фрагменти є перспективними молекулярними біомаркерами для різних патогенних захворювань ЦНС.

Було показано, що фрагментація GFAP генерується кальпаїнами та каспазами [17]. Крім того, фрагменти гліальних проміжних ниток, отримані в результаті протеолізу, також здатні ініціювати агрегацію філаментів і розвивати проапоптотичну властивість. З іншого боку, було показано, що мідь виявляє дозозалежний проапоптотичний ефект у кількох лініях ракових клітин. Таким чином, іони міді можуть стимулювати надекспресію GFAP в астроцитах, а також індукувати фрагментацію GFAP, що має спричинити зниження вмісту GFAP.

Отримані в нашому дослідженні результати узгоджуються з даними, представленими іншими авторами, які показали фрагментацію GFAP за участю каспази-3.

У головному мозку хребетних надекспресія GFAP пов'язана з посиленням виведення прозапальних факторів. У наших експериментах ми спостерігали модуляцію експресії NF-kB, яка супроводжується підвищенням GFAP у риб з групи, підданої впливу міді. Способи активації NF-kB багатогранні. Активація NF-kB в астрогліальних клітинах може бути ініційована різними стимулами, включаючи надлишок АФК та реактивацію клітин. У світлі цих спостережень природно припустити, що індукована міддю реактивація астроцитів у мозку риби регулюється шляхами, що залежать від NF-kB. Один з них може керувати перебудовою цитоскелета та реакцією клітини на токсичну дію забруднювачів навколишнього середовища.

Крім того, астрогліальна реактивація в мозку риби супроводжувалася модуляцією як ключових регуляторів транскрипційної активності: NF-kB (рис. 1 і 2), так і ферменту, що відновлює ДНК PARP. Отримані результати демонструють залежний від дози вплив меді на реакцію клітин нервової тканини на токсичний вплив.

Останні досягнення в секвенуванні транскриптомів продемонстрували широке поширення транскрипційної активності NF-kB у багатьох хребетних і безхребетних, що повинно бути доказом універсальної ролі цього регулювання. Вивчення ролі NF-kB в регуляції клітинної реакції в мозку риби може бути плідним для прояснення перемикання сигнального шляху на виживання клітин нервової тканини. Більше того, з'ясування регуляції транскрипції в клітинах мозкової тканини може дати нам інформацію про межі реактивації клітин, спричиненої надзвичайно токсичним забрудненням навколишнього середовища.

Регуляція реакції клітин на вплив токсичних ксенобіотиків вимагає гострого балансу в системі активації-інгібування NF-kB [18]. Надмірна активація NF-kB може спричинити порушення рівня транскрипції прозапальних факторів, що тягне за собою його витік і, нарешті, загибель клітини. Однак помірна активація забезпечує виживання клітин і направляє шляхи до детоксикації. Активація NF-kB тісно пов'язана з окислювальним стресом. Зростання вільних радикалів є одним із звичайних факторів, які викликають залежну від NF-kB клітинну відповідь. Нещодавно було продемонстровано роль антиоксидантів у регуляції активності NF-kB p65 у молоді білого амура [19]. Більше того, було показано, що окислювальний стрес, викликаний надмірним вмістом міді, можна запобігти активацією NF-kB в культурах клітин ембріональних нирок людини та ембріональних фібробластів миші.

Кілька досліджень продемонстрували прооксидантну дію міді на тканини деяких риб [5]. Однак у нашому дослідженні ми визначили залежний від часу ефект, що підтримує гіпотезу про кумулятивну токсичну дію іонів міді. Нервова тканина має низьку антиоксидантну дію, а також більш інтенсивне споживання кисню в порівнянні з іншими тканинами. Таким чином, під час токсичного впливу, особливо іонів міді, можуть накопичуватися пошкодження нервової тканини, викликані АФК.

Реактивація гліальних клітин, що спостерігається в нашому дослідженні, супроводжується модуляцією експресії NF-kB і PARP-1. Отримані результати можуть відображати функціональний зв'язок між перебудовою гліального цитоскелета та відповіддю активаційної клітини на токсичність міді.

Більше того, відсутність значущого дозозалежного ефекту сублетальних доз міді може бути викликано множинними зворотними зв'язками між молекулярними мішенями як NF-kB, так і PARP-1. Беручи до уваги, що PARP-1 може запускати клітини до апоптозу, різні дози іонів міді можуть порушити баланс у запрограмованій регуляції загибелі клітин.

Відновлення пошкоджень ДНК є однією з ключових функцій PARP. Проте є багато даних про те, що PARP може брати участь у модуляції загибелі клітин мозкової тканини, ініційованої різними розладами [20]. або глутаматними інсультами [21]. Переактивація PARP в процесі реакції клітин супроводжується надмірним споживанням його субстратів, особливо NAD+, і, як наслідок, виснаженням рівня АТФ. Тривала і надмірна активація PARP викликає дефіцит метаболічної енергії, що провокує перемикання сигнальних шляхів на загибель клітини.

Беручи до уваги, що PARP бере участь у клітинній відповіді як коактиватор NF-kB у трансляційній регуляції прозапальних факторів, активність PARP може модулювати експресію білків, які беруть участь у запальному каскадному процесі, а також в універсальних кіназних шляхах, які стимулюють реактивність клітин позитивного зворотного зв'язку. Таким чином, спостерігається в нашому дослідженні нелінійна залежність у експресії GFAP, PARP та NF-kB може бути суперпозицією множинних шляхів, які модулюють клітинну відповідь проти токсичності Cu.

Представлене дослідження проведено з використанням сублетальної дози Cu^{2+}, яка спричиняє стресову реакцію в мозку риб. Однак досі невідомо, який відсоток клітин може загинути внаслідок такої тимчасової експозиції. Таким чином, дослідження токсичності міді вимагає відповідних досліджень, які визначать реакцію в культурах клітин мозку.

Висновки.

Отримані результати свідчать про те, що підвищення GFAP є біомаркером різних типів нейротоксичності, виявлені зміни цього цитоскелетного компонента є доказом токсичної дії іонів міді в клітинах нервової тканини. Представлені в нашому дослідженні диференційні зміни експресії GFAP, NF-kB і PARP в мозку риби можуть відображати комплексну реактивацію, індуковану іонами міді в клітинах мозку райдужної форелі. Сублетальні дози іонів міді можуть спровокувати дерегуляцію важливих шляхів, які контролюють клітинну відповідь на токсичність іонів важких металів. NF-kB-залежні шляхи є важливими як для реактивації клітин, так і для життєздатності клітини.

Наші результати вказують на те, що активація NF-kB, PARP, а також астрогліоз в мозку риб може бути важливою для виживання тварин у середовищі з підвищеною концентрацією міді.

Використана література

1. Calomeni, A. J., Kinley, C. M., Geer, T. D., Iwinski, K. J., Hendrikse, M., & Rodgers, J. H. Jr. Relationship among aqueous copper half-lives and responses of *Pimephales promelas* to a series of copper sulphate pentahydrate concentrations. (2018). Ecotoxicology, 27(3), 278–285. doi: 10.1007/s10646-018-1893-9.
2. Picon-Camacho, S.M., Marcus-Lopez, M., Bron, J.E., & Shinn, A.P. (2012). An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius miltifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. Parasitology, 139(2), 149–190. https://doi.org/10.1017/S0031182011001867
3. Parks, A.N., Cantwell, M.G., Katz, D.R., Cashman, M.A., Luxton, T.P., Clar, J.G., Perron, M.M., Portis, L., Ho, K.T., & Burgess, R.M. (2018). Assessing the release of copper from nanocopper-treated and conventional copper-treated lumber into marine waters II: Forms and bioavailability. Environ Toxicol Chem. 37(7), 1969–1979. doi: 10.1002/etc.4140.
4. Marcussen, H., L?jmand, H., Dalsgaard, A., Hai, D.M., & Holm, P.E. (2014). Copper use and accumulation in Catfish Culture in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering, 49(2), 187–192. http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2013.838869.
5. Wang, B., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Kuang, S.Y., Jiang, J., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Liu, Y., & Zhou, X.Q. (2015). Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF-kB, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine. Aquatic Toxicology, 158, 125–137. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.025
6. Thomsen, R., Daugaard, T.F., Holm, I.A., & Nielsen, A.L. (2013). Alternative mRNA splicing from the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene generates

isoforms with distinct subcellular mRNA localization patterns in astrocytes. Plos One, 8(8), e72110. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072110
7. Nedzvetsky, V.S., Tuzcu, M., Yasar, A., Tikhomirov, A.A., & Baydas, G. (2006). Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats. Biochemistry (Moscow), 71(3), P. 239–244. https://doi.org/10.1134/ S0006297906030023
8. Nedzvetsky V. S., Agca C. A., Baydas G. The peptidoglycan fraction enriched with muramyl pentapeptide from lactobacillus bulgaricus inhibits glioblastoma U373MG cell migration capability and upregulates PARP1 and NF-kB levels. Biotechnologia Acta, V. 13, No 2, 2020, P. 65-79.
9. Razmara P, Sharpe J, Pyle GG. Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) chemosensory detection of and reactions to copper nanoparticles and copper ions. Environ Pollut. 2020, 260, 113925. doi: 10.1016/ j.envpol.2020.113925
10. Nedzvetsky, V. S., Sukharenko, E. V., Kyrychenko, S. V., & Baydas, G. (2018). Soluble curcumin prevents cadmium cytotoxicity in primary rat astrocytes by improving a lack of GFAP and glucose-6-phosphate-dehydrogenase. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 9(4), 501–507. doi:10.15421/021875
11. Łuczyńska, J., Paszczyk, B., & Łuczyński, M.J. (2018). Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. Ecotoxicol Environ Saf. 30(153), 60–67. doi: 10.1016/j.ecoenv. 2018.01.057.
12. Dornelles Zebral, Y., Roza, M., da Silva Fonseca, J., Gomes Costa, P., St?rmer de Oliveira, C., Gubert Zocke, T., Lemos Dal Pizzol, J., Berteaux Robaldo, R., & Bianchini, A. (2019). Waterborne copper is more toxic to the killifish Poecilia vivipara in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. Aquat Toxicol. 209, 142–149. doi: 10.1016/j.aquatox. 2019.02.005.
13. Tseng, H.L., Li, C.J., Huang, L.H., Chen, C.Y., Tsai, C.H., Lin, C.N., & Hsu, H.Y. (2012). Quercetin 3-O-methyl ether protects FL83B cells from copper induced oxidative stress through the PI3K/Akt and MAPK/Erk pathway. Toxicology and Applied Pharmacology, 264(1), 104–113. https://doi.org/10. 1016/j.taap.2012.07.022
14. Marcussen, H., L?jmand, H., Dalsgaard, A., Hai, D.M., & Holm, P.E. (2014). Copper use and accumulation in Catfish Culture in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic Hazardous Substances and Environmental Engineering, 49(2), 187–192. http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2013.838869.
15. Tan, F., Wang, M., Wang, W., & Lu, Y. (2008). Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals *in vitro*. Toxicology in Vitro, 22(1), 164–170. https://doi. org/10.1016/j.tiv.2007.08.020
16. Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., & Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). Neurochemical Research, 25(9-10), 1439–1451. https://doi.org/10.1023/A:1007677003 387
17. Chen, M. H., Hagemann, T. L., Quinlan, R. A., Messing, A., & Perng, M. D. (2013). Caspase cleavage of GFAP produces an assembly-compromised proteolytic fragment that promotes filament aggregation. ASN Neuro, 5(5), 293–308. http://dx. doi. org/10.1042/AN20130032.
18. Cao, L., Ding, W., Jia, R., Du, J., Wang, T., Zhang, C., Gu, Z., & Yin, G. (2017). Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of glycyrrhetinic acid on CCL_4-induced damage in precision-cut liver slices from Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. jian) through ınhibition of the NF-kB pathway. Fish and Shellfish Immunology, 64, 234–242. http://dx.doi.org/10. 1016/j.fsi.2017.03.007
19. Zeng, Y.Y., Jiang, W.D., Liu, Y., Wu, P., Zhao, J., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., & Feng, L. (2016). Dietary alpha-linolenic acid/linoleic acid ratios modulate ıntestinal immunity, tight junctions, anti-oxidant status and mRNA levels of NF-kB p65, MLCK and Nrf2 in Juvenile Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish and Shellfish Immunology, 51, 351–364. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.026
20. Formentini L., Arapistas P., Pittelli M., Jacomelli M., Pitozzi V., Menichetti S., Romani F., Giovannelli L., Moroni F., Chiarugi A. (2008). Mono-galloyl glucose derivatives are potent poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors and partially reduce PARP-1-dependent cell death. Br J Pharmacol. 155(8), 1235–1249. doi: 10.1038/bjp.2008.370
21. Wang X., Li H., Ding S. (2014). The Effects of NAD + on Apoptotic Neuronal Death and Mitochondrial Biogenesis and Function after Glutamate Excitotoxicity. Int J Mol Sci. 15(11), 20449–20468. doi: 10.3390/ijms151120449 Meli, 2004

UDC 577.112.5/ 632.95

Nedzvetsky V. S., Masiuk D. M. Molecular markers of cytotoxicity induced with copper-contained pesticides

Animal Husbandry of the Steppe of Ukraine. 2022. 1. (1). 130-140
Dnipro State Agrarian and Economic University, 25 S. Efremova St., Dnipro, 49000, Ukraine

The applying copper sulphate is a cheap, however it leads to global the environment contamination. Especially, the contamination of the water sources is crucial for fish harvesting and farming. The copper contamination in some areas are caused by decades. The impact of copper ions is dependent on the inhibition

of invasive aquatic plants, many microorganisms and protozoa. The family of copper-contained chemicals is frequently used as algaecides in swimming pools. Despite the copper ions are well known as a high toxic for fish in freshwater ponds, the copper sulphate remains one of the prevalent pesticides in fish farming everywhere. High cytotoxicity and accumulation of the copper ions in the sediments require studying and calculation of the optimal dosage to use it as an antiseptic agent that should prevent the detrimental effect in various tissue types of aquatic organisms. The main depicted mechanism, which is associated with cytotoxicity is the generation of oxidative stress.

Neural tissue cells are extremely susceptible to oxidative damages. Neural damaging is important cause of the CNS disfunction as well as is the critic to the organism vitality. Glial cells maintain the structure and many vital functions of neuronal cells. Glial fibrillary acidic protein (GFAP), transcriptional nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) are critic regulators in a cell response to the environment toxicity. Based on this fact, it could be applied as the boimarkers of heavy metal toxicity. In presented study, we investigated the effects of copper ions on PARP, NF-kB, and GFAP expression in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain tissue. For 96 hours the fishes were exposed to the copper sulphate sublethal concentrations 380 µg/L, estimated as 1/4 of the LC50 value. Western blot analysis of GFAP, NF-kB and PARP was used to assess further effects in the brain tissue.

The modulatory effect of copper ions on the expression of GFAP was detected in fish brain. Reciprocal changes were observed in respect with 24 hours exposure in compare to both 48 hours and 96 hours treatment. Obtained results demonstrated meaningful disturbance in the expression of transcriptional factor NF-kB in the brain of fish group exposed to copper in compare to control group. Furthermore, the time-depended effect in a range 24 – 96 hours was detected. However, the short time exposure to copper ions initiated no effect in fish group treated 24 hours while in compare to both 48 hours and 96 hours treatment. The similar changes of PARP content in the brain of fish were determined as well. It deserves to be mentioned that all of aforementioned changes of GFAP, NF-kB and PARP expression were accompanied by increasing in reactive oxygen species content. Thus, copper ions cytotoxic effect could be initiated with oxidative injury in a brain tissue.

On the other hand, the observed effect of copper in the fish brain evidences the unspecific toxicity of this ion in brain tissue cells.

The results showed that copper ions could induce astroglial response accompanied by modulations of NF-kB and PARP-1 expression. Obtained in presented study data suggest that copper sulphate has significant effect on astrogliosis and DNA damage in the fish brain.

Key words: *rainbow trout, cytoskeleton, transcription factors, glial cells, cytotoxicity.*