

УДК 577.156 + 612.015

О. В. Сухаренко¹, Р. О. Новіцький², В. С. Недзвецкий²

¹Керченський морський технологічний університет

²Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

ВИКОРИСТАННЯ БІОМАРКЕРІВ МОЗКУ ДОННИХ РИБ ДЛЯ ОЦІНКИ ЗАБРУДНЕННЯ КЕРЧЕНСЬКОЇ ПРОТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ

Комплексні іхтіотоксикологічні, біохімічні та імунохімічні дослідження, збирання матеріалу та спостереження проводили на мелководді бухти Керченська, в зоні надзвичайної екологічної ситуації після корабельної аварії 2007 року. За результатами досліджень у Керченській протоці та умовно чистій акваторії р. Ворскла отримано дані про порушення метаболізму специфічного білка цитоскелета нейроглії бичка-пісочника (*Neogobius fluviatilis*) внаслідок негативного впливу нафтопродуктів на донні біотопи Керченської протоки та гідробіонтів. Оцінено стан популяції бичка-пісочника за допомогою визначення рівня астрогліальної реактивності мозку. Результати зумовлюють необхідність екологічного моніторингу донних біотопів цього району Чорного моря.

Е. В. Сухаренко¹, Р. А. Новицкий², В. С. Недзвецкий²

¹Керченский морской технологический университет

²Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАРКЕРОВ МОЗГА ДОННЫХ РЫБ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ КЕРЧЕНСКОГО ПРОЛИВА ЧЕРНОГО МОРЯ

Комплексные ихтиотоксикологические, биохимические и иммунохимические исследования, сбор материала и наблюдения проводили на мелководном участке бухты Керченская в зоне чрезвычайной экологической ситуации после корабельной аварии 2007 года. По результатам исследований в Керченском проливе и условно чистой акватории р. Ворскла получены данные о нарушении метаболизма специфического белка цитоскелета нейроглии бычка-песочника (*Neogobius fluviatilis*) в результате негативного воздействия нефтепродуктов на донные биотопы Керченского пролива и гидробионтов. Оценено состояние популяции бычка-песочника с помощью определения уровня астроглиальной реактивности мозга. Результаты обуславливают необходимость экологического мониторинга донных биотопов этого региона Черного моря.

E. V. Sukharenko¹, R. A. Novitsky², V. S. Nedzvetsky²

¹Kerch Sea Technology University

²Oles Honchar Dnepropetrovsk National University

USING BIOMARKERS OF GROUND FISH BRAIN FOR POLLUTION ASSESSMENT OF THE KERCH STRAIT (THE BLACK SEA)

Fish were sampled at the shallow part of the Kerch Strait, where the shipwreck brought to ecological emergency in 2007. There were used ichthyotoxicology, biochemistry and immunochemistry methods for the research of fish populations. Comparative investigation of samples from both polluted and uncontaminated

regions (Vorskla River) shows the changes in metabolism of cytoskeleton proteins of astrocytes from the monkey goby *Neogobius fluviatilis*. The results are evidence of the neural cell pathology of ground fish from the polluted region. The neural system pathology could be a result of long-term effect of oil pollution in the Kerch Strait. There was shown the validity of the *N. fluviatilis* brain's astroglial reactivity for the assessment of the population state. The presented data substantiate the necessity of ecological monitoring of the shallow biotopes of that region of the Black Sea.

Вступ

Відносне зниження промислових викидів за останні роки принципово не відбивається на екологічному стані водних біоресурсів України [1; 2; 15]. Це зумовлено низкою об'єктивних причин. У деяких регіонах навіть зафіксоване значне погіршення показників забруднення акваторій. Наприклад, із 2000 по 2005 р. із 10 до 30 тисяч зростає кількість суден, що проходять по Керч-Єнікальському каналу [14]. Суттєво збільшився об'єм перевантажень, велика частина яких припадає на вугілля, кокс, кальциновану соду, феросплави, мінеральні добрива. Інтенсифікація судноплавства спричинила зростання ерозійних процесів і прогресуючої реседиментації донних відкладів [4; 6]. Збільшенню забруднення акваторії сприяла робота декількох морських портів і рейдово-перевантажувальних комплексів.

Суттєве погіршення екологічного стану району спричинила аварія 6 російських суден у водах Керченської протоки 11 листопада 2007 р. внаслідок шторму. За різними оцінками, в морське середовище потрапило 1 300–1 600 т нафтопродуктів та 2 000–2 500 т технічної сірки [7]. Після такої великої корабельної аварії район Керченської протоки офіційно оголошено зоною надзвичайної ситуації [10].

При проведенні досліджень акваторії Керченської протоки встановлено, що значна частина нафтопродуктів, які потрапили в море, осіла на морське дно. У результаті десорбції нафтопродуктів із донних відкладів кількість малотрансформованої фракції смол і асфальтенів у придонних і поверхневих водах стійко зростала, досягнувши пікових значень у листопаді 2008 року (0,223 мг/л). У водах придонного горизонту концентрація смол і асфальтенів значно перевищувала (3,2 ГДК) аналогічні показники поверхневого горизонту (2,4 ГДК). У 2009 р. рівень забруднення придонних вод був також значно вищий за рівень забруднення поверхневого горизонту. Характерна особливість складу придонних вод березня – червня 2009 року – високий вміст фракції смол і асфальтенів, що у 5,3–31,0 раз перевищував максимальний вміст цих сполук у придонних водах до аварії [3].

Ситуація, що склалася в Керченській протоці, вимагає комплексної оцінки на всіх рівнях організації біологічних систем. Необхідно встановити небезпечність впливу існуючих забруднень на екосистему Керченської протоки. Присутні в екосистемі нафтопродукти можуть бути джерелом критичного впливу на стан біоценозів акваторії. Критичний рівень забруднень нафтопродуктами, за якого починається деградація донних біоценозів, зміни трофічної структури бентосу, складає 1 мг/г сухої ваги [9]. Представники зообентосу – основні об'єкти живлення донних промислових риб, і саме тому забруднення донних відкладів може викликати порушення екологічної рівноваги у популяціях донних риб (бичків кругляка та пісочника (*Neogobius melanostomus*, *N. fluviatilis*), кефалі сингиля (*Liza aurata*) і лобана (*Mugil cephalus*), камбали-калкана (*Psetta maotica*), камбали-глоси (*Platichthys flesus luscus*)).

Анатомо-морфологічні характеристики риб не завжди є об'єктивними показниками рівня забруднення. Ці показники – дуже далекі похідні біохімічних, молекулярних і клітинних порушень. На користь цього свідчать результати порівняльно-морфологічного аналізу: виявлено відсутність істотних відмінностей показників риб із

забруднених і умовно чистих водойм [11; 13]. У сучасних умовах особливої актуальності набувають дослідження молекулярних механізмів, які лежать в основі фізіологічних, репродукційних та інших біологічних процесів, є основою неспецифічної реакції організму на критичні зміни довкілля. Чутливий індикатор рівня комбінованої дії токсинів на рівновагу метаболічних процесів – клітини нервової тканини. Найчутливіші клітини нервової тканини – астроцити. Незважаючи на різноманіття, кількість і локалізацію астроцитів, зумовлену їх видовими особливостями, обов'язковим компонентом цитоскелета цих клітин є гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ). Підвищений синтез ГФКБ – характерний показник реакції астроцитів у відповідь на ушкодження внаслідок дії несприятливих чинників різної природи [22; 24].

Мета дослідження – оцінити особливості астрогліозу, вміст специфічного цитоскелетного маркера астроглії – гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у мозку бичка-пісочника (*Neogobius fluviatilis*), який є типовим представником промислових донних риб Керченської протоки.

Матеріал і методи досліджень

Іхтіотоксикологічні, біохімічні та імунохімічні дослідження, збирання матеріалу та спостереження проводили на акваторії р. Ворскла (притока Дніпродзержинського водосховища) у межах існуючого іхтіологічного заповідника, що практично не потрапляє під техногенний вплив, і зони узбережжя бухти Керченська, в якій розташована низка діючих портових комплексів.

Іхтіологічний матеріал (38 екз. *Neogobius fluviatilis*) відібрано відповідно до загальноприйнятих методик [8; 12] у водах Керченської бухти у травні – червні 2011 року. Для порівняльного аналізу наведено також результати, отримані у 2010 р. на забрудненій ділянці р. Самара. Візуально спостерігали особливості фенотипу риб, аналізували морфологічні характеристики. Відповідно до методики оцінювали відсоток особин із різними морфологічними та фізіологічними аберациями [11; 12].

Склад поліпептидних фрагментів ГФКБ визначали імунохімічними методами. Фракції розчинних і цитоскелетних білків мозку риб отримували шляхом диференційного центрифугування у буфері з низькою іонною силою та буфері з 4 М сечовиною, як це описано раніше [18]. Визначення вмісту та поліпептидного складу гліальних філаментів проводили за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1 : 2 500 [18].

Відносну інтенсивність забарвлення поліпептидних зон вимірювали за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу. Кількісний аналіз ГФКБ проводили шляхом порівняння інтенсивності забарвлення відповідних поліпептидних зон, що були віднесені до кількості загального білка у фракції. Загальний білок визначали методом О. Лоурі в модифікації Г. Л. Міллера [20]. Рівень перекисного окиснення ліпідів вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (Oxis, Int. Inc., USA) [23]. Обробку отриманих даних проводили методами математичної статистики для малих вибірок [5]. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини та стандартної похибки середньої. Достовірну відмінність між групами оцінювали із застосуванням *t*-критерію Стьюдента ($p < 0,01$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу та відмінність між генеральними дисперсіями.

Результати та їх обговорення

Анатомо-морфологічне дослідження риб у всіх групах не виявило відхилень від нормального розвитку, аберацій і вироджень. У той же час, кількісна оцінка вмісту білка гліальних проміжних філаментів у мозку риб показала значні відмінності досліджених груп (рис. 1). У мозку бичка-пісочника, виловленого у прибережних водах бухти Керченська, виявлено зростання вмісту ГФКБ у 2,28 раза ($p < 0,001$) порівняно з умовно чистою ділянкою (р. Ворскла). Отриманий результат вказує на розвиток гліальної реактивації у результаті метаболічних порушень, викликаних підвищеним вмістом токсинів у придонних біотопах бухти Керченська. Цей показник також вищий, ніж у риб із р. Самара, що вказує на значний несприятливий вплив забруднювачів у бухті Керченська.

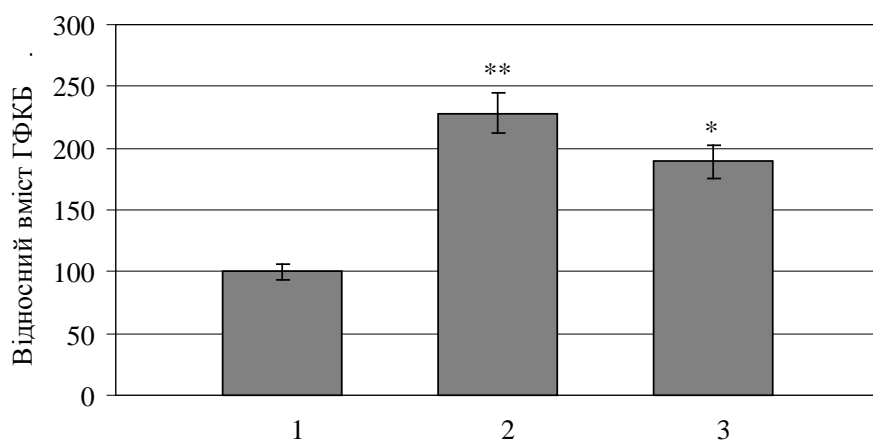


Рис. 1. Відносний вміст ГФКБ у мозку бичка-пісочника бухти Керченська (2), р. Ворскла (1) і р. Самара (3): * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Підвищення вмісту білка гліальних філаментів – наслідок збільшення числа субпопуляцій окремих гліоцитів, у першу чергу, за рахунок диференціації гліальних попередників у зрілі астроцити. У ході диференціації в астроцитах активується експресія білка гліальних проміжних філаментів. Астроцити – спеціалізовані гліальні клітини, число яких більше ніж у п'ятеро перевищує кількість нейронів у ЦНС. Вони щільно, подібно до черепиці, вкривають поверхню нейронів і виконують багато важливих складних функцій ЦНС у нормі. Астроцити відповідають на усі форми інсультів через посередництво характерного процесу, який отримав назву «астрогліоз». Астрогліоз індукується різними за природою чинниками, є ознакою патогенетичних і структурних ушкоджень ЦНС.

Участь астроцитів у репарації ушкоджень ЦНС останнім часом широко вивчається. Використання сучасних досягнень молекулярної та клітинної біології дозволило розкрити природу та деякі механізми астрогліальної реактивної відповіді на дію фізичних, хімічних чинників і метаболічних порушень. Нині відомо, що астрогліоз – не просто феномен відповіді за принципом «так – ні». Цей процес – тонко градуйована послідовність змін, які реалізуються ситуаційно-залежним способом і регулюються як зовнішніми сигналами, так і нейрон-гліальною взаємодією [25]. Зміни, якими супроводжується астрогліоз, спрямовані від зворотних змін експресії генів і клітинної гіпертрофії до тривалого формування рубців і перебудови структури окремих ділянок мозку.

Визначення поліпептидного складу ГФКБ у мозку риб, які мешкають у прибережних зонах бухти Керченська і р. Самара, показало зростання кількості деградованих поліпептидів ГФКБ (рис. 2). Найзначніші зміни ГФКБ виявлено у цитоскелетних фракціях білків.

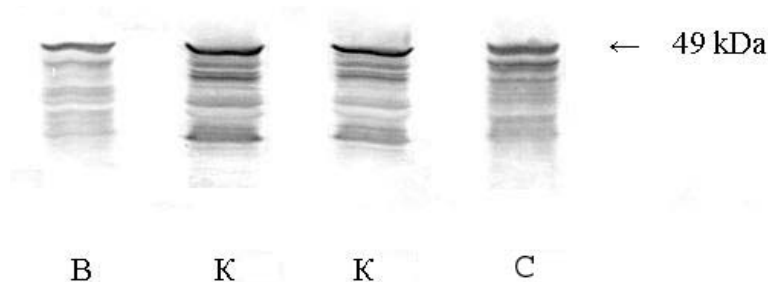


Рис. 2. Результати імуноблотингу цитоскелетних фракцій білків із мозку бичка-пісочника р. Ворскла (В), бухти Керченська (К – дві проби) та р. Самара (С)

Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканині мозку групи риб, виловлених у вищезгаданих ділянках, свідчить про передумови розвитку окисного стресу (рис. 3).

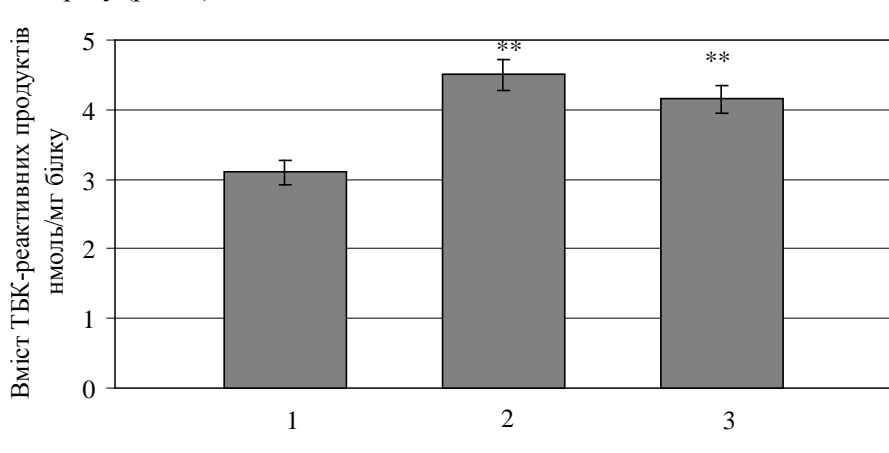


Рис. 3. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у мозку бичка-пісочника р. Ворскла (1), бухти Керченська (2) і р. Самара (3): достовірність відмінності груп 2 і 3 відносно групи 1 (**) $p < 0,01$

Показники окисного стресу та астрогліозу мозку бичка-пісочника бухти Керченська, р. Самара та Ворскла мали високий коефіцієнт кореляції ($r = 0,69 \pm 0,091$ і $r = 0,74 \pm 0,087$ відповідно).

Вивчення відповідних реакцій популяцій донних риб – актуальне завдання при оцінюванні дії несприятливих чинників, у тому числі і десорбції нафтопродуктів із донних відкладів. Риби – зручні об'єкти екологічних досліджень через високу чисельність, поширеність і доступність для вивчення реакції на дію полнотантів [17]. Використання як біомаркерів гістоспецифічних цитоскелетних білків, які виконують життєво необхідні функції і надзвичайно чутливі до дії несприятливих чинників, – перспективний напрям [19; 21]. Як і в інших хребетних, у риб нейроглія відіграє життєво важливу роль у підтриманні та забезпеченні функціонування нейронів. Нейрогліальні клітини особливо важливі для підтримання гомеостазу мозку, репарації ушкоджень, захисту нейронів від різних чинників. Несприятливі дії різної природи індукують характерну

клітинну відповідь глії – астрогліоз. Астрогліоз, тобто реактивація астроцитів, завжди супроводжується активацією фібрилогенезу та синтезу ГФКБ [21]. Надмірно інтенсивний фібрилогенез – головний показник реактивної відповіді астроцитів на нейрональні ушкодження. Перебудова проміжних філаментів астроглії може бути необхідною умовою адекватного функціонування гліальних клітин за дії пошкоджувальних чинників [25].

Виявлене нами підвищення експресії білка гліальних проміжних філаментів свідчить про індукований астрогліоз, тобто функціональну відповідь нейроглії на дію несприятливих факторів. Характерне збільшення кількості деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ – ознака цитоскелетних перебудов, порушення стану цитоскелета, морфології та функціонування клітин нервової тканини. Отже, стан гліального цитоскелета може бути індикаторним показником токсичної дії нафтового забруднення морських вод.

Окисний стрес розглядається як одне з найпоширеніших метаболічних порушень, викликаних дією несприятливих чинників [16]. Проміжні високореактивні продукти окисного стресу – важлива причина нейродегенерації та зниження життєздатності в умовах дії токсичних забруднювачів різної природи. Дія промислових поллютантів на організм викликає порушення енергетичного метаболізму клітин, морфологічні та структурні аномалії.

Виявлена в наведеному дослідженні позитивна кореляція показників астрогліозу, тобто стану цитоскелета нейроглії, та окисного стресу в мозку бичка-пісочника з промислово забруднених і умовно чистих ділянок водоєм вказує, що окисні ушкодження можуть бути одним з основних механізмів реалізації токсичних ефектів поллютантів. Порушення на молекулярному рівні лежить в основі патологічних процесів та відбивається на вищих рівнях біологічної організації, у тому числі на структурно-функціональній організації екосистем.

Отриманий результат щодо реактивного астрогліозу в мозку риб, які мешкають у забрудненому середовищі Керченської протоки, вказує на певний рівень адаптації клітин нервової системи до несприятливих умов, викликаних забрудненням.

Висновки

Вивчення впливу забруднювальних речовин на гідроекосистему не може бути виконане проведенням дослідів лише на організмовому рівні, оскільки це дозволяє виявити аномальні зміни лише на пізніх стадіях інтоксикації, коли організм перебуватиме на межі загибелі. Дослідження реактивної відповіді астроцитів мозку різних тварин – апробована та результативна методика екотоксикології, що підтверджується і нашими даними. Цитоскелетні перебудови мозку риб виникли під впливом антропогенних чинників. Це дає змогу розглядати ГФКБ як надійний і достовірний маркер токсичного впливу поллютантів, за допомогою якого можна оцінити пошкоджувальні ефекти на ранніх етапах їх прояву, розробити ефективні заходи компенсації патогенетичних порушень.

Отримано дані про порушення метаболізму специфічного білка цитоскелета нейроглії бичка-пісочника з бухти Керченська, які свідчать про негативний вплив нафтопродуктів на донні біотопи Керченської протоки та гідробіонтів, що населяють їх. Наведені результати вказують на необхідність здійснення екологічного моніторингу та комплексного дослідження донних біотопів цього району.

Бібліографічні посилання

1. **Бланк Ю. І.** Екологічні аспекти природокористування в районі Керченської протоки / Ю. І. Бланк, Л. К. Себах, О. А. Петренко // Проблеми екологічної безпеки і розвитку морегосподарського і нафтогазового комплексу. Матер. IV Міжнар. наук.-практ. конф. – Севастополь, 2004. – С. 194–198.
2. **Вплив** перевантаження нафтопродуктів на компоненти екосистеми Керченської протоки. Розвиток підприємств морегосподарського і нафтогазового комплексів. Проблеми екології і економіки / Л. К. Себах, Т. М. Авдеева, С. С. Жугайло та ін. // Проблеми екологічної безпеки і розвитку морегосподарського і нафтогазового комплексу. Матер. V Міжнар. наук.-практ. конф. – Южный-Одесса : Друк, 2006. – С. 111–115.
3. **Вплив** техногенної катастрофи 11 листопада 2007 р. на стан морської екосистеми Керченської протоки / О. А. Петренко, Т. М. Авдеева, Л. К. Себах та ін. // Основні результати комплексних досліджень в Азово-Чорноморському басейні і світовому океані. Тр. ЮгНИРО (т. 47). – 2009. – С. 55–60.
4. **Жугайло С. С.** Сучасний рівень забруднення прибережних вод Керченської бухти / С. С. Жугайло, О. А. Петренко // Екологія міст та рекреаційних зон. Матер. Всеукр. наук.-практ. конф. – Одеса : ІНВАЦ, 2008. – С. 261–264.
5. **Кокунин В. А.** Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – № 6. – С. 776–791.
6. **Кудрик І. Д.** Реседиментація донних відкладень як негативний екологічний наслідок евтрофікації вод Чорного і Азовського морів / І. Д. Кудрик, А. В. Ошкадер, А. А. Бусарова // Рибне господарство України. – 2010. – № 5 (70). – С. 34–37.
7. **Матишов Г. Г.** Экосистемный мониторинг и оценка действия разливов нефтепродуктов в Керченском проливе. Аварии судов в ноябре 2007 г. / Г. Г. Матишов, С. В. Бердников, Р. М. Савицкий. – Ростов-на-Дону : ЮНЦ РАН, 2008. – 73 с.
8. **Методика** збору й обробки іхтіологічних і гідробіологічних матеріалів із метою визначення лімітів промислового вилучення риб із великих водосховищ і лиманів України. – К. : ІРГ, 1998. – 47 с.
9. **Мионов О. Г.** О предельно допустимых концентрациях нефтепродуктов в донных отложениях прибрежной зоны Черного моря / О. Г. Мионов, Н. Ю. Милованова, Л. Н. Кирихина // Гидробиол. журн. – 1986. – Т. 22, № 6. – С. 76–78.
10. **Надзвичайна** ситуація в Керченській протоці – випадковість або неминуча закономірність / О. А. Петренко, С. С. Жугайло, Л. К. Себах та ін. // Проблеми екологічної безпеки і розвитку морегосподарського і нафтогазового комплексу. Матер. VI Міжнар. наук.-практ. конф. – Керч – Одеса : Пасаж, 2008. – С. 10–14.
11. **Наумов В. М.** Методы сбора и обработки ихтиологических проб. Информ. обзор. Вып. 1. Рыбохозяйственное использование ресурсов Мирового океана // В. М. Наумов, А. П. Мусатов. – М. : ЦНИТЗИРХ, 1976. – 48 с.
12. **Правдин И. Ф.** Руководство по изучению рыб. – М. : Пищ. пром-сть, 1966. – 376 с.
13. **Сухаренко Е. В.** Новые молекулярные биомаркеры состояния гидробионтов в условиях антропогенного загрязнения / Е. В. Сухаренко, В. С. Недзвецкий, Р. А. Новицкий // Рибне господарство України. – 2011. – № 6. – С. 49–54.
14. **Фашук Д. Я.** Екологічні проблеми Боспора Кіммерійського / Д. Я. Фашук, С. Н. Овсиенко, О. А. Петренко // Чорноморський вісник. – 2007. – № 1. – С. 52–78.
15. **Фашук Д. Я.** Керченська протока – найважливіша транспортна артерія і рибпромисловий район Азово-Чорноморського басейну / Д. Я. Фашук, О. А. Петренко // Південь Росії: екологія, розвиток. – 2008. – № 1. – С. 15–22.
16. **Baydas G.** Neuroprotection by α -lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes / G. Baydas, E. Donder, M. Kiliboz // Biochemistry. – 2004. – Vol. 69, N 9. – P. 1001–1005.
17. **Bucher F.** Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.) / F. Bucher, R. Hofer, W. Salvenmoser // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1992. – N 23. – P. 410–419.

18. **Effects** of vitamin *E* against aluminum neurotoxicity in rats / V. S. Nedzvetskii, M. Tuzcu, A. Yasar, A. A. Tikhomirov // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 71, N 3. – P. 239–244.
19. **Kalman M.** Glial fibrillary acidic protein – immunopositive structures in the brain of a crocodilian, caiman crocodilus, and its bearing on the evolution of astroglia / M. Kalman, M. Pritz // *The J. of Comparative Neurology*. – 2001. – P. 460–480.
20. **Miller G. L.** Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31, N 5. – P. 964–966.
21. **Nedzvetskiy V. S.** Hyperthyreosis effects on the learning, memory and glial intermediate filaments of a rat brain / V. S. Nedzvetskiy, P. A. Nerush // *Int. J. Physiology and Pathophysiology*. – 2011. – Vol. 2, is. 3.70. – P. 269–278.
22. **Norton W. T.** Quantitative aspects of reactive gliosis: A review / W. T. Norton, D. A. Aquino, I. Hozumi // *Neurochem. Res.* – 1992. – Vol. 17, N 9. – P. 877–885.
23. **Ohkawa H.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, N 2. – P. 351–358.
24. **Ridet J. L.** Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function / J. L. Ridet, S. K. Malhotra, A. D. Privat // *Trends Neurosci.* – 1997. – Vol. 20, N 12. – P. 570–577.
25. **Sofroniew M. V.** Astrocytes: Biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters // *J. Acta Neuropathol.* – 2010. – Vol. 119. – P. 7–35.

Надійшла до редколегії 24.08.2012