

В. С. Недзвецький^{1,2}✉, В. Я. Гассо¹, А. М. Гагут¹, І. А. Гассо¹

¹Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара,
просп. Гагаріна, 72, м. Дніпро, Україна, 49010

²Бінгольський університет, м. Бінгьол, Туреччина

ВПЛИВ ЗАБРУДНЕННЯ КАДМІЄМ НА ГЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ МОЗКУ: НАСЛІДКИ ТА БІОІНДИКАЦІЙНІ МОЖЛИВОСТІ

Кадмій (Cd) – важкий метал, який наразі присутній майже в усіх компонентах довкілля. Cd є повсюдним забруднювачем, що постійно надходить у навколишнє середовище з промислових та сільськогосподарських джерел, гірничодобувної промисловості, лісових пожеж тощо. Окремі професійні захворювання мають ускладнення, пов'язані з цитотоксичністю Cd. Незважаючи на тривале вивчення токсичних ефектів Cd, цитотоксичність низьких доз та хронічний вплив цього токсиканту на клітини нервової тканини залишаються нерозкритими. Результати визначення нейротоксичності Cd свідчать про порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру, акумуляцію Cd у мозку та погіршення функціональної активності центральної нервової системи. Одними з найбільших клітинних мішеней для Cd у мозку є астроцити, які забезпечують живлення та функціональну активність нейронів, а також відновлення фізичних та метаболічних ушкоджень. Цитоскелет астроцитів побудований із гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ). ГФКБ бере участь у важливих функціях астроцитів і його стан відображає реактивність астроцитів. Молекулярні механізми нейротоксичного впливу Cd на гліальний цитоскелет залишаються невідомими. Для досліджень цитотоксичних механізмів різних сполук, включаючи важкі метали як клітинні моделі астроцитів, широко використовуються гліобластоми. Ураховуючи роль окисного стресу в клітинних ушкодженнях, а також реактивну відповідь гліальних клітин, у представленій роботі досліджено ефекти низьких доз Cd на показники окисного стресу та експресію ГФКБ і глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г6ФД) у клітинах лінії U373GM. Показано, що дози 2-10 μM Cd індукували дозозалежне зростання реактивних сполук кисню та продуктів переокисного окиснення ліпідів. Ці самі дози інгібували експресію цитоскелетного маркера астроцитів ГФКБ і метаболічного маркера утилізації глюкози Г6ФД. Отримані результати свідчать про виразний цитотоксичний ефект низьких доз Cd в астроцитарній клітинній моделі U373GM. До того ж астрогліальна цитотоксичність Cd може бути опосередкована окисними ушкодженнями, пригніченням експресії гліальних проміжних філаментів і розладом утилізації глюкози. Визначені параметри можуть бути багатообіцяльними біомаркерами токсичного впливу як для оцінки стану здоров'я людини, тварин, так і для визначення стану навколишнього середовища в цілому.

Ключові слова: окисний стрес, гліальний фібрилярний кислий білок, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, клітини U373, біомаркер.

✉ Tel.: +38099-783-33-25. E-mail: nedzvetskyvictor@ukr.net

DOI: 10.15421/442006

V. S. Nedzvetsky^{1,2}✉, V. Ya. Gasso¹, A. M. Hahut¹, I. A. Hasso¹

¹*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine*

²*Bingöl University, Bingöl, Turkey*

INFLUENCE OF CADMIUM CONTAMINATION ON BRAIN GLIAL CELLS: CONSEQUENCES AND BIOINDICATION POSSIBILITIES

Cadmium (Cd) is a heavy metal that currently presents in almost all components of the environment. Cd is a ubiquitous pollutant that is constantly entering the environment from industry and agriculture, mining, forest fires and many more sources. Some occupational diseases have aftereffects associated with Cd cytotoxicity. Despite long-term studies of the toxic effects of Cd, its cytotoxicity of low doses and the chronic effects on the nerve tissue cells remain undiscovered. The results of determining the Cd neurotoxicity indicate a disturbance of the permeability of the blood-brain barrier, the accumulation of Cd in the brain and the deterioration of the functional activity of the central nervous system. One of the main cellular targets for Cd in the brain are astrocytes. Astrocytes provide nutrition and functional activity of neurons, as well as recovery of physical and metabolic damage. The cytoskeleton of astrocytes is built of glial fibrillary acidic protein (GFAP). GFAP participates in important functions of astrocytes and its condition reflects the astrocytes reactivity. The molecular mechanisms of the neurotoxic effects of Cd on the glial cytoskeleton remain unknown. Glioblastomas are widely used to study the cytotoxic mechanisms of various compounds, including heavy metals, as cellular models of astrocytes. Taking into account the role of oxidative stress in a cell damage, as well as the reactive response of glial cells, we study the influence of low doses of Cd on oxidative stress and expression of GFAP and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in U373GM cells. Doses of 2-10 μM Cd induced a dose-dependent increase in reactive oxygen species and lipid peroxidation products. The same doses inhibited the expression of the cytoskeletal marker of astrocytes (GFAP) and metabolic marker of glucose utilization (G6PD). The obtained results indicate a pronounced cytotoxic effect of low doses of Cd in the astrocytic cell model U373GM. In addition, the astroglial cytotoxicity of Cd may be mediated by oxidative damage, inhibition of glial intermediate filament expression, and glucose utilization disorders. These parameters can be promising biomarkers of toxic effects both for the assessment of human and animal health and for determining the state of the environment as a whole.

Key words: oxidative stress, glial fibrillary acidic protein, glucose-6-phosphate dehydrogenase, U373 cells, biomarker.

Вступ

У наш час визначення нових біомаркерів є важливим елементом прогностичної, профілактичної та персоналізованої медицини. Пошук валідних інформативних біомаркерів стану здоров'я людини і тварин допоможе пришвидшити розроблення успішних нових технологій раннього виявлення, діагностики та лікування захворювань [3, 46].

З іншого боку, відомо, що якість довкілля, яке безпосередньо впливає на здоров'я, можна оцінювати за допомогою біоіндикаторів. Стан здоров'я людини можна визначати з використанням біомаркерів впливу або наслідків цього

впливу. Вважається, що можливо і вигідно розробити біоіндикатори, які можна використовувати для оцінки впливу забруднення та його наслідків як на людину, так і на інші групи організмів. Такі показники можуть бути придатними як для оцінки стану здоров'я людини, так і для визначення стану навколишнього середовища. Їх можна використовувати для оцінки стану екосистем тут і зараз, а також для тривалого моніторингу змін, що відбуваються з часом [5].

Різноманітні екотоксиканти призводять до багатьох порушень життєдіяльності клітин та цілих організмів. Токсичні ефекти йонів кадмію (Cd) привертають особливу увагу дослідників у зв'язку з прогресивним ростом забруднення сполуками Cd усіх сфер довколишнього середовища в останні десятиліття. Цей важкий метал є повсюдним забруднювачем і постійно надходить у навколишнє середовище з промислових та сільськогосподарських джерел [43]. Нові згубні наслідки Cd, що були недавно виявлені, дозволили обґрунтовано класифікувати кадмій як канцероген для людини Міжнародним агентством з дослідження раку (IARC) [49]. Вплив Cd може спричинити шкідливі наслідки практично для кожної життєво важливої системи. Вважається, що різні дози Cd, а також гостра та хронічна експозиція викликають порушення основних метаболічних шляхів у життєво важливих тканинах, включаючи серце, печінку, кишечник, нирки та мозок [21, 33, 38]. Визначена суттєва різниця в чутливості окремих тканин до пошкодження, спричиненого Cd [48]. Печінка та нирки серед усіх життєво важливих органів визнані найбільш чутливими до токсичності Cd [21]. До того ж період напіввиведення Cd із клітин є надзвичайно довгим і становить 10–30 років [16]. Це свідчить про те, що як хронічний, так і гострий вплив Cd може призвести до накопичення цього важкого металу в клітинах життєво важливих тканин, включаючи мозок [50]. Доведено, що Cd спричиняє клітинну загибель шляхом ініціювання різних шляхів програмованої смерті, які індукуються стресом ендоплазматичної мережі, внутрішньоклітинного вивільнення кальцію, а також опосередкованими мітохондріальними uszkodженнями та окисним стресом [37]. Нещодавно Lee та співавтори [30] продемонстрували як *in vitro*, так і *in vivo* вплив токсичності Cd на р53-залежну програмовану загибель клітин проксимальних каналців нирок. Однак серед багатьох типів клітин, які є мішенню Cd, нейротоксичні ефекти цього металу залишаються недостатньо вивченими.

Результати досліджень цитотоксичності Cd у клітинах нервової тканини представлені лише в обмеженій кількості статей. Нейротоксичний ефект Cd у дітей був досліджений у 70–80-х роках минулого століття і присутній у кількох дослідженнях, але, на жаль, отримані результати, з того часу лише незначно поновлені, приділяють певну увагу. Нещодавно Phuagkhaorong зі співавторами [42] показали накопичення Cd у моделі клітин астроцитом U-87 MG. Більше того, експозиція 10 мкМ CdCl₂ викликала морфологічне порушення цих гліальних клітин та стимулювала прозапальну клітинну відповідь. Нейрозапалення відіграє ключову роль у патогенезі багатьох розладів ЦНС, включаючи нейродегенерацію. Крім того, нещодавне епідеміологічне дослідження представило результати суттєвого взаємозв'язку між високим умістом Cd у крові та порушеннями навчання [10]. Інше дослідження продемонструвало зв'язок впливу кадмію зі зниженням ефективності нейро-поведінкових завдань, що вимагають уваги та сприйняття [8]. Більше того, нещодавно наявність чутливих до впливу Cd субпопуляцій людини була визначена в рамках дослідження

старіння [9]. Ці чутливі субпопуляції визнані групами, які більш інтенсивно поглинають Cd з навколишнього середовища. Таким чином, токсичність Cd може бути, принаймні частково, пов'язана з розладами ЦНС, а також з розвитком когнітивних порушень. Механізм ініціювання великої кількості ускладнень, спричинених Cd, може бути пов'язаний з генеруванням окисного стресу [13]. Незважаючи на численні дослідження, механізми нейротоксичності Cd залишаються невідомими [31]. Останні дані показали, що токсичний ефект Cd може бути спрямований переважно на функції гліальних клітин [32, 36]. Гліальні клітини представлені в мозку хребетних трьома основними типами, зокрема – мікроглія, астроцити та олігодендроцити. Астроцити є найбільш поширеною гліальною популяцією, а також поширеним типом клітин у ЦНС ссавців [4]. Астроцити – це багатофункціональні клітини, які підтримують гомеостаз мозку завдяки забезпеченню життєздатності нейронів і захищають його від цитотоксичних пошкоджень. Ушкодження мозку викликають особливу реакцію астроцитів – реактивний астрогліоз [41]. Ця реакція спрямована на відновлення пошкоджених ділянок мозку та функцій нейронів. Таким чином, нейротоксичні особливості кількох сполук можуть бути визначені контролем астрогліальної реактивності у функціональній взаємодії нейрон-глія-ендотеліальна клітина. Розуміння цитотоксичних ефектів Cd у гліальних клітинах може розкрити актуальні питання сучасного світу, що пов'язані з нейротоксичністю цього металу. Показано, що токсичність Cd може спричинити окисний стрес, порушення внутрішньоклітинного балансу Ca^{2+} та провокувати апоптоз в клітинах мозку [51]. Таким чином, вплив Cd може бути фактором, який призводить до окисного стресу та прозапальної реактивності в клітинах нервової тканини.

Цитоскелет еукаріотичних клітин бере участь у ряді життєво важливих процесів, особливо у клітинній реакції на вплив цитотоксичних іонів металів [36]. Крім того, цитоскелет – це динамічна структура, яка забезпечує як форму клітини, так і внутрішньоклітинні регуляторні шляхи [15, 26]. Цитоскелет астроцитів містить проміжні нитки, сконструйовані зі специфічних субодиниць гліального кислого фібрилярного білка (GFAP). GFAP бере участь у більшості ключових функцій астроцитів, є добре відомим маркером реактивності астроцитів [11] та реагує на дію екотоксикантів [53, 54].

Ми досліджували вплив малих доз Cd на стан білка проміжних філаментів астроцитів гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) та маркера енергетичного метаболізму глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г6ФД).

Матеріали та методи досліджень

Усі використовувані хімічні речовини були отримані від Sigma-Aldrich. Культура гліобластоми U373MG була отримана від ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA). Використовували клітини гліомних ліній, які походять від астроцитів, і широко застосовуються у токсикологічних дослідженнях як їх адекватна модель [35, 42].

Клітини вирощували в модифікованому Дюльбеко середовищі Ігла (DMEM), що містило 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS), 25 мМ глюкози, 1 % L-глутаміну, 1 % пірувату натрію та 1 % пеніцилін-стрептоміцину. Клітини культури висівали в колбу площею 75 см² та культивували в цьому середовищі при температурі 37° С у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂. Після того як конfluентність клітин досягала 85–95 %, клітини обробляли трипсин-ЕДТА

розчином, збирали, центрифугували і засівали у чашки Петрі (3 см Ø) 2×10^5 клітин на чашку. Наступного дня клітини промивали ЗФР і вносили середовище DMEM, що не містило FBS. У середовище клітин експериментальних груп додавали стоковий розчин 1мМ CdCl₂ з розрахунку кінцевої концентрації 2, 5 і 10 мкМ.

Клітинам контрольної групи додавали відповідний об'єм DMEM. Клітини інкубували у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при температурі 37° С протягом 48 годин. Згодом клітини збирали за допомогою пластикового скрепера без використання трипсинізації. Клітини ресуспендували у середовищі, центрифугували 5 хв при 500 g і переносили клітинний осад у пластикові пробірки, заморожували при -80 °С та зберігали до проведення наступних досліджень.

Тест на життєздатність клітин.

Рівень життєздатності клітин вимірювали за допомогою МТТ-тесту, використовуючи здатність живих клітин зменшувати кількість 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ), відновлюючи його до формазану. Вплив Cd на життєздатність первинних клітин астроглії вивчали при різних концентраціях протягом 48 год. Клітини збирали з чашок Петрі, суспендували в DMEM, доповнювали 10 % FBS і розводили до концентрації 10^5 клітин / мл. Астроцити висівали в 96-лункові планшети при 2×10^4 клітин на лунку та інкубували 12 годин при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂. Після приєднання клітин і початку росту в кожній лунці середовище змінювали і клітини піддавали впливу різних концентрацій Cd (10 мкМ). Контрольні клітини не піддавались впливу будь-якого розчину. Концентрації Cd були обрані на основі літературних даних [20, 30]. Кожна контрольна концентрація та концентрація Cd була представлена трьома лунками і повторена двічі. Середовище видаляли з планшетів через 48 годин інкубації, а лунки промивали натрій-фосфатним буфером (PBS). Після промивання розчин, який містив 180 мкл PBS і 20 мкл реагенту МТТ, додавали в кожну лунку. Клітини інкубували з реагентом МТТ (0,5 мг / мл кінцевої концентрації) протягом 4 год при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂. Після інкубації розчин МТТ видаляли і додавали 180 мкл ДМСО в кожну лунку з наступною інкубацією протягом 10 хв. Рівень поглинання вимірювали у присутності 20 мкл буфера Соренсена при довжині хвилі 570 нм. Отримані дані були представлені у відсотках до контрольної величини.

Оцінка перекисного окиснення ліпідів.

Кінцеві продукти перекисного окислення ліпідів MDA+4-гідроксиалкени визначали за допомогою вимірювання поглинання комплексної MDA-тіобарбітурової кислоти спектрофотометричним методом при 532 нм. Як стандарт використовували тетраетоксипропан [40].

Визначення внутрішньоклітинної продукції реактивних сполук кисню (РСК).

Виробництво внутрішньоклітинних загальних форм РСК визначали за допомогою хлорметил-дихлордигідрофлуоресцеїнадіацетату (DCFHDA). Клітини обробляли 10 мкМ DCFHDA та інкубували 30 хв при 37 °С. Вимірювання рівня РСК проводили за допомогою спектрофлуорометра SpectraMax Gemini EM із довжиною хвилі збудження 485 нм та випромінюванням 530 нм.

Проведення імуноблотингу.

Лізис клітин проводили в буфері RIPA, що містив коктейль інгібіторів протеїнази та фосфатази. Екстракти білків з контрольних та експонованих різними дозами CdCl_2 клітин гліоми U373 отримували шляхом інкубації ресуспендованих клітин у лізис-буфері протягом 60 хв при 4 °C. Згодом лізати центрифугували при 20 000 g протягом 20 хв. Уміст загального білка в супернатантах вимірювали спектрофотометром за методом Бредфорда з модифікаціями [39], використовуючи бичачий сироватковий альбумін (BSA) як стандарт. Супернатант кожного білкового екстракту розводили 1:1 у буфері Леммлі, що містив 0,1 М дитиотреїтолу і витримували при температурі 95 °C протягом 5 хв. Отримані зразки білка заморожували і зберігали при -20 °C до проведення електрофорезу.

Білки розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у 7–17%-му градієнті акриламіду. Розподілені у гелі білки переносили електричним полем (10 В/см) на полівінілфторидну мембрану (PVDF) протягом 120 хв. Після переносу мембрани промивали ЗФР та блокували у 1%-ному розчині BSA. Надалі мембрани інкубували зі специфічними первинними антитілами проти досліджуваних білків, а саме анти-ГФКБ (Santa Cruz, sc-9065), анти-Г6ФД (Abcam, ab76598) та анти- β -актину для контролю навантаження зразків загальним білком (Abcam, ab15246). Вторинні антикролячі антитіла IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому (Abcam, ab6721), використовувались для детекції первинних антитіл на мембрані. Імунозabarвлення проводили розчином люмінол-перекис водню за допомогою посиленого методу хемілюмінісценції із застосуванням рентгенівських плівок (Konica Minolta, Японія). Денситометричний аналіз результатів імунозabarвлення проводили із застосуванням програмного забезпечення TotalLab TL120 (США). Значення інтенсивності, отримане за допомогою сканування кожної смуги, нормалізувалось до інтенсивності відповідної смуги актину. Кожен трек на відсканованій картинці був скомпенсований до рівня фону, який відповідає неактивній площі на рентгенівській плівці.

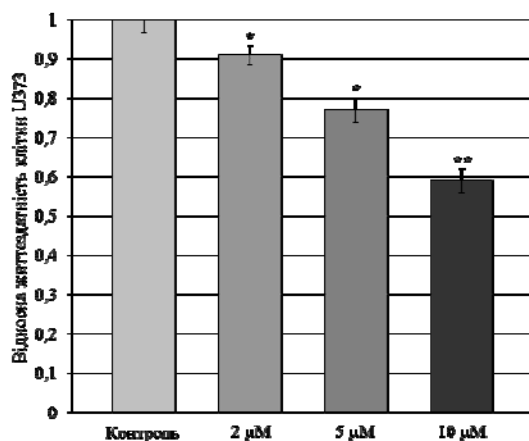
Статистичний аналіз.

Статистичне порівняння даних проводили за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з подальшим пост-хок-тестом Тукі. Дані виражаються як середнє значення \pm стандартна похибка середнього щонайменше з чотирьох незалежних експериментів. Значення $P < 0,05$ приймали статистично значущими.

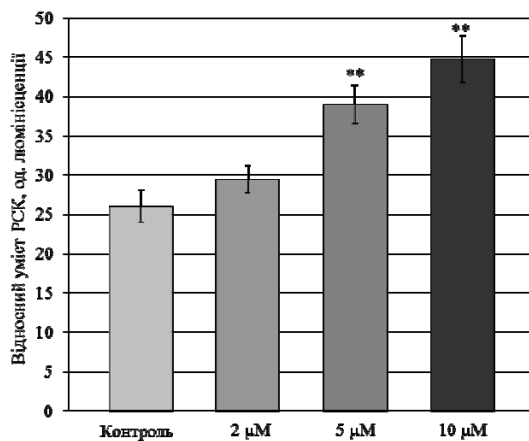
Результати та їх обговорення

Результати оцінювання життєздатності клітин у контролі та експонованих різними концентраціями CdCl_2 показали дозозалежний цитотоксичний ефект 5 мкМ та 10 мкМ CdCl_2 у гліальних клітинах лінії U373 (рис. 1, а). Однак рівень загибелі в популяції клітин, які були експоновані дозою 2 мкМ CdCl_2 , статистично не відрізнявся від такого показника в контрольній популяції.

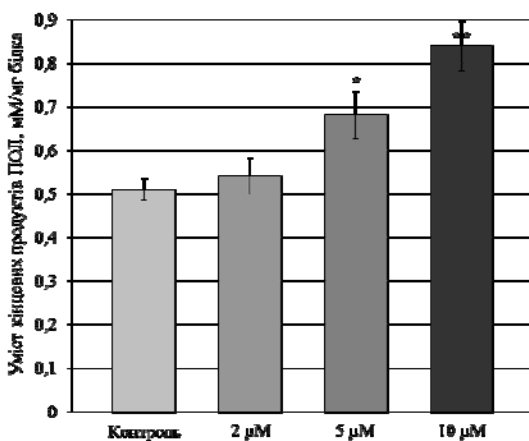
Результати внутрішньоклітинної продукції РСК у контролі та у всіх експонованих групах клітин U373 показали збіжний з показником життєздатності дозозалежний ефект зростання внутрішньоклітинного вмісту РСК (рис. 1, б). Доза Cd 10 мкМ викликала в клітинах U373 статистично достовірне збільшення РСК.



a



б



в

Рис. 1. Життєздатність (*a*), уміст РСК (*б*) та кінцевих продуктів ПОЛ (*в*) в експонованих 2, 5 та 10 μM Cd клітинах гліобластоми U373. M ± SE; n = 4
* P < 0,05, ** P < 0,01.

Результати визначення вмісту кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах лінії U373 продемонстрували значний вплив малих доз Cd на цей визнаний індекс окисних ушкоджень біомембран. Експозиція Cd ініціювала в культурі клітин первинних астроцитів дозозалежне зростання вмісту ПОЛ. Однак статистично достовірне зростання вмісту кінцевих продуктів ПОЛ було виявлене лише у клітинах, що були експоновані дозою 5 та 10 мкМ CdCl₂.

Експозиція гліальних клітин малими дозами CdCl₂ індукувала зміни вмісту ГФКБ в усіх експериментальних групах. Однак достовірно значущі відмінності були визначені у клітинах експонованих дозами 5 та 10 мкМ CdCl₂. У діапазоні цих доз виявлено виражений дозозалежний характер пригнічення експресії ГФКБ як результат ушкоджуючої дії йонів Cd. У той же час доза 2 мкМ CdCl₂ сприяла незначному зниженню вмісту ГФКБ.

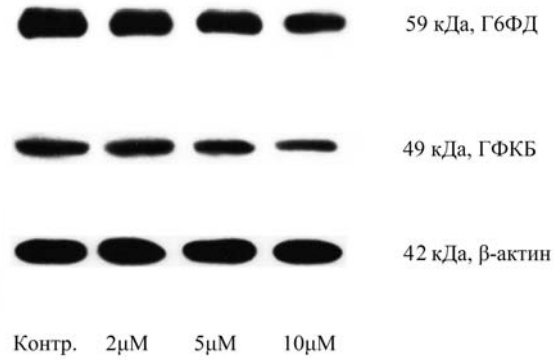
Результати визначення вмісту Г6ФД у гліальних клітинах U373 показали, що дози 5 та 10 мкМ CdCl₂ можуть індукувати пригнічення експресії Г6ФД (рис. 2). До того ж експозиція 10 мкМ CdCl₂ протягом 48 годин значно потужніше пригнічувала експресію Г6ФД у порівнянні з дозою 5 мкМ CdCl₂.

Загалом отримані результати вказують на те, що малі дози йонів Cd можуть індукувати окисний стрес та дерегуляцію експресії білків у гліальних клітинах. Рівень вищезазначених білків нормалізували до вмісту β-актину, враховуючи той факт, що в літературі відсутні дані про модуляцію експресії β-актину йонами Cd.

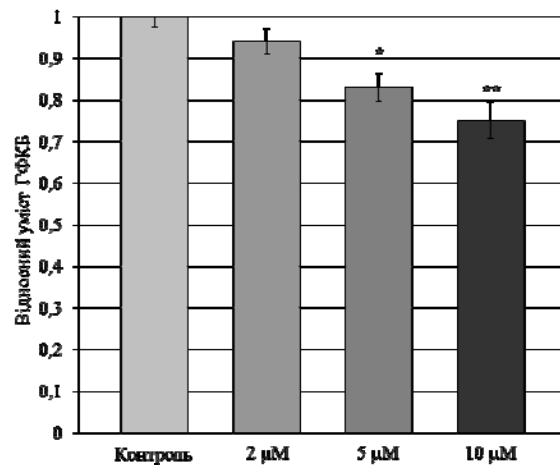
Активация перекисного окиснення ліпідів – один із шляхів дії екотоксикантів [52]. Результати дослідження показали, що дози 5 і 10 мкМ CdCl₂ здатні індукувати надмірну продукцію РСК та активацію ПОЛ у гліальних клітинах. Більше того, зниження життєздатності клітин астроцитів супроводжувалось як збільшенням внутрішньоклітинної генерації РСК, так і зростанням ПОЛ. Таким чином, розвиток окисного стресу може бути однією з головних причин цитотоксичної дії низьких доз Cd у гліальних клітинах.

Як правило, кадмій індукує генерацію РСК опосередковано, впливаючи на антиоксидантні системи, особливо на каталазу, супероксиддисмутазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу [1, 45]. Більше того, Cd може пригнічувати неферментний антиоксидантний захист. Ім та співавтори [20] представили дані про те, що CdSO₄ у діапазоні доз 10-30 мкМ ініціював загибель клітин у первинній культурі кортикальних астроцитів та виснаження глутатіону. У цьому дослідженні автори продемонстрували нелінійну сигмоїдну залежність як від часу, так і від дозозалежної цитотоксичності Cd. Отримані в нашому дослідженні результати показників окисного стресу, зокрема зростання продукції РСК та вмісту кінцевих продуктів ПОЛ, що були індуковані малими дозами Cd, так само мали нелінійну залежність доза – ефект. Загалом представлені результати підтверджують гіпотезу про те, що Cd ініціює окисний стрес, через різні механізми пригнічуючи системи антиоксидантного захисту.

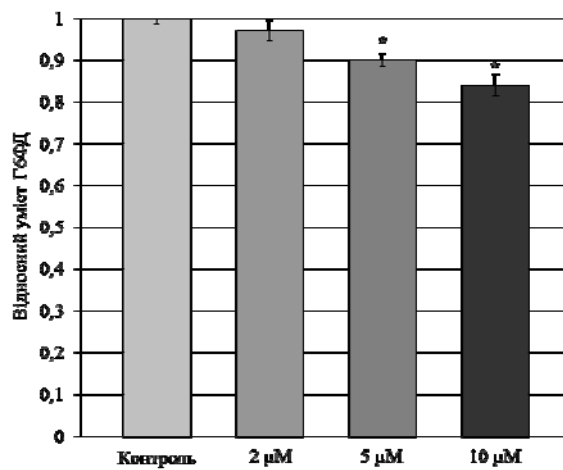
Однією з важливих мішеней цитотоксичності Cd розглядаються цитоскелетні білки та фактори, що контролюють динамічні перебудови цитоскелету [36]. Цитоскелет еукаріотичних клітин бере участь у ряді життєво важливих процесів, особливо у клітинній реакції на вплив цитотоксичних іонів металів [47]. Крім того, цитоскелет – це динамічна структура, яка забезпечує як форму клітини, так і внутрішньоклітинні регуляторні шляхи [15, 26]. Гліальні клітини розглядаються як основна та чисельна популяція в тканинах мозку.



a



б



в

Рис. 2. Результати імуноблотингу (а) та вміст ГФКБ (б), Г6ФД (в) та β-актину в експонованих 2, 5 та 10 μМ Cd клітинах гліобластоми U373. $M \pm SE$; $n = 4$
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Астроцити та мікрогліальні клітини забезпечують захист нейронів від цитотоксичності та підтримку багатьох функцій нейронів. Цитоскелет астроцитів містить проміжні філаменти, побудовані з унікального для цих клітин білка – ГФКБ. На відміну від інших представників проміжних філаментів, які представлені переважно нерозчинними у цитозолі субодиницями, в астроцитах існують філаментна (нерозчинна) і цитозольна (розчинна) форми ГФКБ [2]. ГФКБ бере участь у більшості ключових функцій астроцитів і є добре відомим маркером їх реактивності [11]. У попередніх дослідженнях показано, що нейротоксичність Cd може бути пов'язана з молекулярним механізмом перебудови цитоскелету клітин у мозку, а також життєво важливими функціями астроцитів [36].

Критична роль окисного стресу в нейротоксичних ефектах Cd була продемонстрована в дослідженні протекторної дії антиоксиданту куркуміну в астроцитах, що були експоновані 10 мкМ CdCl₂ [36]. Куркумін ефективно попереджав розвиток окисного стресу та зниження життєздатності астроцитів, що були спричинені впливом Cd.

Наступний результат нашого дослідження показав, що в експонованих Cd клітинах U373 індукується зростання гибелі клітин та зниження вмісту цитоскелетного білка ГФКБ. Таким чином, виявлена Cd-індукована загибель гліальних клітин асоційована з втратою вмісту гліальних проміжних філаментів. Зниження вмісту ГФКБ, з одного боку, може бути наслідком пригнічення експресії і синтезу нових субодиниць. З іншого – втрата ГФКБ може бути спричинена активацією протеолітичних систем, включаючи каспази, які спроможні розщеплювати гліальні проміжні філаменти [24].

З огляду на множинні токсичні ефекти Cd, пригнічення експресії ГФКБ і Г6ФД може бути наслідком генерації окисного стресу і порушень механізмів транскрипційної регуляції експресії, що було недавно показано в культурі первинних астроцитів. Експозиція первинних астроцитів мозку щурів дозою 10 мкМ CdCl₂ викликає суттєве інгібування транскрипційного фактора NF-κB, який контролює експресію генів імунної відповіді, апоптозу та клітинного циклу [36]. NF-κB розглядається як транскрипційний фактор, який контролює як антиоксидантну, так і запальну клітинну відповідь [7, 29]. Існують докази того, що Cd може, навпаки, індукувати дію NF-κB. Відповідно цей шлях спрямований на підтримку життєздатності клітин. Однак тривала стимуляція NF-κB, а також зворотний зв'язок між запаленнями та продуктами окисного стресу можуть спричинити несприятливі клітинні явища, порушення регуляторних шляхів і загибель клітин. Отримані результати показали, що у первинних астроцитах 48-годинний вплив Cd викликав підвищення регуляторної активності NF-κB [42], пов'язаний зі збільшенням смерті клітин. Недавно Phuagkhaorong зі співавторами продемонстрували підвищену секрецію інтерлейкінів IL-6 та IL-8, активацію NF-κB p65. Але, на відміну від наших результатів, доза 10 мкМ CdCl₂ в їх дослідженні мала мінімальний вплив на морфологію та життєздатність клітин. Цілком можливо, такий результат може бути пояснений різними лініями гліальних клітин та їх здатністю генерувати специфічну для астроцитів реактивну відповідь на цитотоксичну дію Cd [18].

Інший шлях, що обумовлює цитотоксичні ефекти низьких доз іонів Cd, може бути пов'язаний із виснаженням відновленого глутатіону та відсутністю антиоксидантної здатності астроцитів, як це було визначено в первинних

астроцитах мишей під впливом CdSO_4 [20]. Багато цитотоксичних ефектів Cd визнано наслідком виникнення окисного стресу. Однак іон Cd не може брати участь у ефекті Варбурга, як залізо. Таким чином, його згубний ефект може бути опосередковано пов'язаний з ініціацією виробництва РСК, а також з окислювальним стресом. Одним із ключових характеристик Cd є здатність зв'язувати SH-групи білків [14]. Беручи до уваги, що багато ензимів та регуляторних факторів мають активний центр, що містить SH-групу, Cd може інактивувати їх шляхом безпосереднього зв'язування.

Отримані в нашому дослідженні дані про пригнічення проміжних гліальних філаментів можуть відображати непрямий вплив цитотоксичності Cd на цей тип цитоскелету. Проміжні філаменти в еукаріотичних клітинах представлені специфічними для певних типів клітин білками, які здатні полімеризуватися без участі будь-яких ферментів. Асоціація проміжних філаментів проходить через те, що субодиниці цих структур цитоскелету мають велику кількість SH-груп. Більшість з них пов'язані з інтактною структурою філаментів, але ці групи знаходяться в динамічно збалансованій рівновазі, що забезпечує перманентні перебудови цитоскелету в метаболічно активних клітинах [34]. Будь-який токсичний чинник може ініціювати клітинну відповідь і, таким чином, активізувати метаболізм і перебудови цитоскелету. Однак експозиція Cd індукує зниження вмісту ГФКБ, на відміну від інших цитотоксичних факторів, дія яких сприяє реактивації астроцитів і підвищенню експресії ГФКБ [28]. Таким чином, зменшення експресії ГФКБ у представленому дослідженні може бути пов'язане зі здатністю Cd зв'язувати SH-групи проміжних гліальних філаментів.

Забезпечення енергетичного балансу у стресованих клітинах є одним з критичних факторів збереження життєздатності і виживаності різних клітинних типів. Результати нашого дослідження вказують на важливу особливість цитотоксичності Cd, а саме здатність пригнічувати експресію ключового ензиму енергетичного метаболізму Г6ФД. Г6ФД є цитозольним ензимом, що входить до пентозофосфатного шляху і забезпечує синтез НАДФ-Н з НАДФ⁺. Саме НАДФ-Н необхідний для підтримки рівня відновленого глутатіону, синтезу жирних кислот та ізопреноїдів. Таким чином, гліотоксичність Cd може бути опосередкована як погіршенням продукції НАДФ-Н і зниженням біоенергетичного потенціалу клітин, так і пригніченням антиоксидантного потенціалу через інгібування синтезу відновленого глутатіону.

Клітинна реакція на токсичний вплив вимагає метаболічного споживання енергії. Г6ФД є ключовим регуляторним ферментом пентозофосфатного шляху та контролює метаболізм глюкози. Г6ФД відіграє вирішальну роль у рості та проліферації клітин [19]. У нашому дослідженні ми визначили статистично значуще зниження Г6ФД. Зниження вмісту Г6ФД у клітинах, стресованих дією йонів Cd, може бути важливою подією в патогенетичному ланцюзі, яка може зменшити життєздатність клітин. Таким чином, беручи до уваги отримані результати, ми можемо припустити, що Cd може інгібувати життєздатність первинних астроцитів через порушення метаболізму глюкози.

Аналіз специфічної експресії білка – це потужний підхід до характеристики молекулярних механізмів цитотоксичності, ініційований різними факторами, включаючи екотоксиканти. За даними кількісної ПЦР щодо стійкості генів експресії маркерів базової експресії білка у райдужної форелі на

гостру інтоксикацію Cd та міді (Cu) виявлено різний вплив на визнані маркери базової експресії та вміст загального білка, зокрема, таких як β -актин, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (ген GAPDH), Г6ФД, рибосомний білок L8 тощо. Стабільність еталонних генів залежала від природи йона металу і типу клітини. Таким чином, дія Cd може впливати на окремі визнані маркери рівня базової експресії [44]. Результат, представлений у нашій роботі, відповідає вищезазначеним даним щодо модуляції експресії Г6ФД у гліальних клітинах U373 під впливом іонів Cd. Отримані результати досліджень проміжних гліальних філаментів показали зниження вмісту ГФКБ у культурі гліальних клітин експонованих низькими дозами CdCl₂ протягом 48 годин у порівнянні з контрольними необробленими клітинами. Пригнічення цитоскелету астроцитів Cd може визначати клітинну реакцію на цитотоксичність і бути однією з причин пригнічення життєздатності клітин. Реактивність астроцитів регулюється кількома факторами і спрямована, як правило, на відновлення пошкоджень та забезпечення життєздатності клітин нервової тканини [17]. Незважаючи на цю здатність захищати клітини нервової тканини, надмірне стимулювання реактивності астроцитів може бути шкідливим для функціонального відновлення нейронів. Надмірний реактивний астрогліоз може бути ключовою причиною багатьох дисфункцій нейронів, включаючи хронічне запалення та цитотоксичні пошкодження на ділянках, що оточують надмірно активовані астроцити. Таким чином, отримані результати свідчать на користь того, що йони Cd індукують порушення балансу динамічних перебудов гліальних проміжних філаментів і разом з цим пригнічують спроможність астроцитів генерувати адекватну реактивну відповідь на клітинні ушкодження.

Незважаючи на те, що виявлені чисельні фактори активації астроцитів, вплив окремих надзвичайно поширених екоотоксикантів залишається незрозумілим. Як правило, реактивний астрогліоз пов'язаний з інтенсифікацією метаболізму і посиленою продукцією ГФКБ. Активація експресії ГФКБ у мозку людини і тварин є загально визнаним маркером реактивного астрогліозу [11]. Астрогліоз пов'язують з інтенсивним зростанням запалення, що супроводжує багато неврологічних захворювань, включаючи хвороби Паркінсона та Альцгеймера, а також аміотрофічний бічний склероз [7]. З іншого боку, окремі чинники викликають астрогліальну депресію, пригнічують метаболічну активність гліальних клітин і їх життєздатність. Нещодавно Морі та співавтори [32] продемонстрували вплив Cd на цитоскелет та морфологію нервових стовбурових клітин-попередників. Концентрація субцитотоксичного Cd може спричинити порушення морфології клітин-попередників, що відображає цитотоксичність впливу Cd у ході розвитку нейронів і нейрональних функцій. Результати, що отримані в нашому дослідженні відносно астрогліального цитоскелету, відповідають впливу Cd на нервові клітини-попередники, представлені Морі та співавторами.

Ще однією з найважливіших функцій астроцитів є їх участь у формуванні і підтриманні гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Дослідження *in vivo* та *in vitro* продемонстрували роль астроцитів у регуляції мозкового кровотоку за допомогою, зокрема, регулювання активності ендотеліоцитів [27]. Wang і Du [50] представили дані про низьку або невизначаєму концентрацію кадмію в здоровому мозку людини, що свідчить про потужну функцію ГЕБ проти проникнення Cd. З іншого боку, накопичення Cd у мозку було

продемонстровано в осіб, що зазнали його впливу, та у пацієнтів з ушкодженнями мозку [12]. Більше того, Cd може стимулювати надмірну експресію молекул міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1), що є валідним показником пошкодження ГЕБ в ендотеліальних клітин малих судин [22]. Слід зазначити, що остаточна структура ГЕБ недостатньо вивчена у хребетних організмів молодого віку [6]. Таким чином, нейротоксичність Cd може призвести до згубних наслідків у ранньому постнатальному періоді та визначити хронічні розлади ЦНС.

Враховуючи той факт, що астроцити разом з ендотеліальними клітинами судин формують ГЕБ і вплив Cd на ендотеліальні клітини визнаний як один з найпотужніших, нейротоксичні ефекти цього металу можуть мати надзвичайно шкідливі наслідки. Результати щодо виснаження гліального цитоскелету під впливом Cd, отримані в представленому дослідженні, свідчать про можливе пригнічення астрогліальної бар'єрної функції в мозку.

Представлені в нашій роботі результати доповнюють продемонстровані цитотоксичні ефекти Cd в ендотеліальних клітинах мозку [25] та Ca^{2+} -залежний окисний стрес в астроцитах щурів [23, 51]. Беручи до уваги, що астроцити та ендотеліальні клітини разом утворюють ГЕБ, роль цих типів клітин у Cd-індукованому пошкодженні мозку є критичною для підтримки бар'єрної функції та гомеостазу мозку.

Висновки

Отримані результати представленої роботи показали, що малі дози Cd можуть викликати цитотоксичні ефекти в гліальних клітинах. Зокрема, дози 2–10 мкМ Cd спроможні пригнічувати життєздатність клітин, експресію ГФКБ і Г6ФД, що супроводжується порушеннями цитоскелетних структур, продукції НАДФ-Н та пригніченням утилізації глюкози. Визначені показники можуть бути багатообіцяльними біомаркерами токсичного впливу як для оцінки стану здоров'я людини, тварин, так і для визначення стану навколишнього середовища в цілому.

Бібліографічні посилання

1. *Acan N.L., Tezcan E.F.* Inhibition kinetics of sheep brain glutathione reductase by cadmium ion. *Biochemical and Molecular Medicine*. 1995. 54. P. 33-37.
2. *Baydas G., Nedzvetskii V.S., Kirichenko S.V., Nerush P.A.* Astrogliosis in the hippocampus and cortex and cognitive deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes: effects of melatonin. *Neurophysiology*. 2008. 40 (2). P. 105-111.
3. *Biomarker Technology Platforms for Cancer Diagnoses and Therapies*. TriMark Publications, LLC, 2014.
4. [Buosi A.S., Matias I., Araujo A.B., Batista C., Gomes F.](#) Heterogeneity in synaptogenic profile of astrocytes from different brain regions. *Molecular Neurobiology*. 2018. 55 (1). P. 751-762.
5. [Burger J., Gochfeld M.](#) On developing bioindicators for human and ecological health. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2001. 66 (1). P. 23-46.

6. [Cao Y., Chen A., Radcliffe J.](#) Postnatal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environmental Health Perspectives*. 2009. 117 (10). P. 1580-1586.
7. [Chen W.W., Zhang X., Huang W.J.](#) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (review). *Molecular Medicine Reports*. 2016. 13 (4). P. 3391-3396.
8. [Ciesielski T., Bellinger D.C., Schwartz J., Hauser R., Wright R.O.](#) Associations between cadmium exposure and neurocognitive test scores in a cross-sectional study of US adults. *Environmental Health Perspectives*. 2013. 16 (1). P. 7-19.
9. [Ciesielski T., Schwartz J., Bellinger D.C., Hauser R., Amarasiwardena C., Sparrow D., Wright R.O.](#) Iron-processing genotypes, nutrient intakes, and cadmium levels in the Normative Aging Study: Evidence of sensitive subpopulations in cadmium risk assessment. *Environment International*. 2018. 119. P. 527-535.
10. [Ciesielski T., Weuve J., Bellinger D.C., Schwartz J., Lanphear B., Wright R.O.](#) Cadmium exposure and neurodevelopmental outcomes in U.S. children. *Environmental Health Perspectives*. 2012. 120 (5). P. 758-763.
11. [Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L.](#) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical Research*. 2000. 25 (9-10). P. 1439-1451.
12. [Falnoga I., Tusek-Znidaric M., Horvat M., Stegnar P.](#) Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. *Environmental Research*. 2000. 84 (3). P. 211-218.
13. [Farina M., Avila D.S., da Rocha J.B., Aschner M.](#) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. 2013. 62 (5). P. 575-594.
14. [Fotakis G., Timbrell J.A.](#) Modulation of cadmium chloride toxicity by Sulphur amino acids in hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2006. 20 (5). P. 641-648.
15. [Freeman M.R.](#) Specification and Morphogenesis of Astrocytes. *Science*. 2010. 330. P. 774-778.
16. [Fujiwara Y., Lee J.Y., Tokumoto M., Satoh M.](#) Cadmium renal toxicity via apoptotic pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012. 35. P. 1892-1897.
17. [Guzyk M.M., Tykhomyrov A.A., Nedzvetsky V.S.](#) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiostatin levels in retina of diabetic rats. *Neurochemical Research*. 2016. 41 (10). P. 2526-2537.
18. [He W., Li Y., Tian J., Jiang N., Du B., Peng Y.](#) Optimized mixture of As, Cd and Pb induce mitochondria-mediated apoptosis in C6-glioma via astroglial activation, inflammation and P38-MAPK. *American Journal of Cancer Research*. 2015. 5 (8). P. 2396-2408.

19. [Horecker B.L.](#) The pentose phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277. P. 47965–47971.
20. [Im J.Y., Park S.G., Han P.L.](#) Cadmium-induced astroglial death proceeds via glutathione depletion. *Journal of Neuroscience Research*. 2006. 83 (2). P. 301-308.
21. [Järup L., Akesson A.](#) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009. 238. P. 201-208.
22. [Jeong E.-M., Moon C.-H., Kim C.-S., Lee S.H., Baik E.J., Moon C.K., Jung Y.-S.](#) Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF- κ B activation in cerebrovascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. 320 (3). P. 887-892.
23. [Jo C., Koh Y.H.](#) Cadmium induces N-cadherin cleavage via ERK-mediated γ -secretase activation in C6 astroglia cells. *Toxicology Letters*. 2013. 222. P. 117-121.
24. [Jonesco D.S., Hassager C., Frydland M., Kjærgaard J., Karsdal M., Henriksen K.](#) A caspase-6-cleaved fragment of glial fibrillary acidic protein as a potential serological biomarker of CNS injury after cardiac arrest. *PLoS One*. 2019. 14 (11). e0224633.
25. [Jung Y.S., Jeong E.M., Park E.K., Kim Y.M., Sohn S., Lee S.H., Baik E.J., Moon C.H.](#) Cadmium induces apoptotic cell death through p38 MAPK in brain microvessel endothelial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2008. 578. P. 11-18.
26. [Kamphuis W., Kooijman L., Orre M., Stassen O., Pekny M., Elly M.H.](#) GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia*. 2015. 63 (6). 201-218.
27. [Keaney J., Campbell M.](#) The dynamic blood–brain barrier. *FEBS Journal*. 2015. 282. P. 4067-4079.
28. [Kirici M., Nedzvetsky V.S., Agca C. A., Gasso V.Y.](#) Sublethal doses of copper sulphate initiate deregulation of glial cytoskeleton, NF- κ B and PARP expression in *Capoeta umbla* brain tissue. *Regulatory Mechanisms of Biosystems*. 2019. 10 (1). P. 103-110.
29. [Lawrence T.](#) The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009. 6. 16-31.
30. [Lee J.Y., Tokumoto M., Hattori Y., Fujiwara Y., Shimada A., Satoh M.](#) Different regulation of p53 expression by cadmium exposure in kidney, liver, intestine, vasculature, and brain astrocytes. *Toxicology Research*. 2016. 32 (1). P. 73-80.
31. [Mendez-Armenta M., Rios C.](#) Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2007. 23 (3). P. 350-358.
32. [Mori H., Sasaki G., Nishikawa M., Hara M.](#) Effects of subcytotoxic cadmium on morphology of glial fibrillary acidic protein network in astrocytes derived from murine neural stem/progenitor cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015. 40. P. 639-644.

33. [Nair A.R., Degheselle O., Smeets K., Van Kerkhove E., Cuypers A. Cadmium-induced pathologies: Where is the oxidative balance lost \(or not\). International Journal of Molecular Sciences. 2013. 14. P. 6116-6143.](#)
34. [Nakahata Y., Yasuda R. Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. Frontiers in Synaptic Neuroscience. 2018. 10 \(29\).](#)
35. [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- \$\kappa\$ B levels. Biotechnologia Acta. 2020. 13 \(2\). P. 65-79.](#)
36. [Nedzvetsky V.S., Sukharenko E.V., Kyrychenko S.V., Baydas G. Soluble curcumin prevents cadmium cytotoxicity in primary rat astrocytes by improving a lack of GFAP and glucose-6-phosphate-dehydrogenase. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018. 9 \(4\). P. 501-507.](#)
37. [Nilesh M., Kalariya A., Nancy K., Wills B., Kota V., Ramana C., Satish K., Srivastava C., Frederik J.G., Van Kuijk M. Cadmium-induced apoptotic death of human retinal pigment epithelial cells is mediated by MAPK pathway. Experimental Eye Research. 2009. 89. P. 494-502.](#)
38. [Ninkov M., Popov A., Aleksandrov A., Demenesku J., Mirkov I., Mileusnic D., Petrovic A., Grigorov I., Zolotarevski L., Tolinacki M., Kataranovski D., Brceski I., Kataranovski M. Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity. Toxicology Letters. 2015. 237. P. 89-99.](#)
39. [Noble J.E. Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes. Methods in Enzymology. 2014. 536. P. 17-26.](#)
40. [Ohkawa I., Shiga S., Kageyama M. An esterase on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* for the hydrolysis of long chain acyl esters. Journal of Biochemistry. 1979. 86\(3\). P. 643-656.](#)
41. [Pekny M., Wilhelmsson U., Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neuroscience Letters. 2014. 565. P. 30-38.](#)
42. [Phuagkhaopong S., Ospondant D., Kasemsuk T., Sibmooh N., Soodvilai S., Power C., Vivithanaporn P. Cadmium-induced IL-6 and IL-8 expression and release from astrocytes are mediated by MAPK and NF- \$\kappa\$ B pathways. Neurotoxicology. 2017. 60. P. 82-91.](#)
43. [Satarug S., Baker J.R., Urbanjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P.E.B., Williams D.J., Moore M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. Toxicology Letters. 2003. 137 \(1-2\). P. 65-83.](#)
44. [Shekh K., Tang S., Niyogi S., Hecker M. Expression stability and selection of optimal reference genes for gene expression normalization in early life stage rainbow trout exposed to cadmium and copper. Aquatic Toxicology. 2017. 190. P. 217-227](#)
45. [Shukla G.S., Hussain T., Srivastava R.S., Chandra S.V. Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats](#)

following cadmium exposure and subsequent withdrawal. *Industrial Health*. 1989. 27. P. 59-69

46. [Subramaniam N.S., Bawden C.S., Waldvogel H., Faull R.M.L., Howarth G.S., Snell R.G.](#) Emergence of breath testing as a new non-invasive diagnostic modality for neurodegenerative diseases. *Brain Research*. 2018. 1691. P. 75-86.

47. [Sukharenko E.V., Samoylova I.V., Nedzvetsky V.S.](#) Molecular mechanisms of aluminium ions neurotoxicity in brain cells of fish from various pelagic areas. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. 8 (3). P. 461-466.

48. [Swiergosz-Kowalewska R.](#) Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microscopy Research and Technique*. 2001. 55. P. 208-222.

49. [Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D.](#) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*. 2003. 192 (2-3). P. 95-117.

50. [Wang B., Du Y.](#) Cadmium and Its Neurotoxic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013. 5. P. 898-910.

51. [Yang C.S., Tzou B.C., Liu Y.P., Tsai M.J., Shyue S.K., Tzeng S.F.](#) Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008. 103. P. 825-834.

52. *Гаско В.Я., Клименко О.Ю.* Перекисне окиснення ліпідів у прудкої ящірки з екосистем різного ступеня антропогенної трансформації // Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Медицина. 2011. 2, № 2. С. 128-134.

53. *Гаско В.Я., Клименко О.Ю., Недзвецкий В.С.* Состояние цитоскелетных молекулярных компонентов мозга прыткой ящерицы как биомаркер нарушений, индуцированных промышленным загрязнением // *Екологія та ноосферологія*. 2010. 21, № 3–4. С. 98-104.

54. *Гаско В.Я., Клименко О.Ю., Сухаренко Е.В., Недзвецкий В.С.* Оценка негативного эффекта загрязнения биогеоценозов с использованием нейроспецифического цитоскелетного белка прыткой ящерицы // *Екологія та ноосферологія*. 2012. 23, № 1–2. С. 58-66.

Надійшла до редколегії 29.10.2020 р.