

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

Сухаренко Елена Валерьевна¹, кандидат технических наук, доцент

Недзвецкий Виктор Станиславович², доктор биологических наук, профессор

Максимов Владимир Ильич³, доктор биологических наук, профессор кафедры «Физиология, фармакология и токсикология им. А.Н. Голикова и И.Е. Мозгова», проректор Учебно-методического объединения учебных заведений Российской Федерации по образованию в области ветеринарии и зоотехнии

¹ФГБОУ ВО «Керченский государственный морской технологический университет» 298300, г. Керчь, ул. Орджоникидзе, д. 82; тел/факс +8(36561)63585, e-mail: kgmtu@kgmtu.ru¹

²Днепропетровский национальный университет им. О.Гончара 49010, Украина, г. Днепропетровск, пр. Гагарина 72; тел/факс +38(0562)469280, e-mail: cdep@dnu.dp.ua²

³ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»³ 109472, Россия, Москва, ул. Ак. Скрябина, 23; тел/факс +8 (495) 3776331, e-mail: dr.maximov@gmail.com³

Ключевые слова: кадмий, глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ), астроциты, постнатальный период развития мозга.

Исследовали хроническое влияние малых концентраций кадмия на экспрессию и распределение растворимой и цитоскелетной форм глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в мозге крыс в процессе постнатального развития. Показано влияние ионов кадмия как на содержание растворимого и филаментного ГФКБ, так и на состав полипептидных фрагментов промежуточных филаментов. Длительная интоксикация ионами кадмия (с питьевой водой в концентрации 10 мкМ на протяжении 6-ти недель) приводит к достоверному ($P < 0,01$) реципрокному уменьшению растворимой формы ГФКБ и бифуркационным изменениям содержания филаментной формы. Представленные результаты свидетельствуют о нарушении динамики формирования цитоскелетных структур, развития отдельных популяций астроцитов в коре, гиппокампе и мозжечке, а также риске нейродегенерации в процессе развития.

Введение

Кадмий, как фактор окружающей среды, является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов для большинства филогенетических групп позвоночных, негативно влияющий на многие физиологические и биохимические процессы организма. Вследствие высокой способности Cd^{2+} накапливаться в тканях, активировать процессы генерации реактивных соединений кислорода (РСК), индуцировать процессы пероксидного окисления липидов (ПОЛ), блокировать сульфгидрильные и аминокислотные группы белков, в том числе и ферментов-

антиоксидантов, многие типы клеток обладают высокой чувствительностью к ионам кадмия даже в низких концентрациях [1]. Учитывая, что в течение двух последних десятилетий наблюдается стойкая тенденция значительного роста загрязнения кадмием окружающей среды, изучение молекулярных механизмов действия ионов этого металла в период раннего развития организма особенно актуально.

Достаточно уязвимой для повреждающего действия кадмия является центральная нервная система (ЦНС), поскольку клетки нервной ткани характеризуются зна-

чительной интенсивностью окислительного метаболизма, максимальным, относительно других тканей, содержанием субстратов ПОЛ и относительно слабой системой антиоксидантной защиты. При изучении влияния ионов кадмия на ЦНС доказано, что его присутствие индуцирует морфологические изменения в кортикальных астроцитах, нарушает гомеостаз внутриклеточного кальция в первичных нейронах мозга крыс, ухудшает процессы миелинизации и, как следствие, вызывает апоптоз клеток [2]. Имеются данные, что низкие дозы Cd^{2+} снижают экспрессию шаперонов в нейронах, не вызывают значительных изменений содержания этих белков в астроцитах и повышают их экспрессию в эндотелиальных клетках [3]. Известно, что инкубация культивируемых эксплантов спинного мозга эмбрионов человека в растворе $CdCl_2$ на протяжении 24 часов вызывает значительные изменения в соотношении моторных нейронов и глиальных клеток вентральных рогов спинного мозга [4]. Эти данные дают основания предполагать, что ионы кадмия оказывают существенное влияние на соотношение нейронов и глиальных клеток, провоцируют нарушения процесса развития мозга.

Показано, что кратковременного поступления (в течение 28 часов) низких доз хлорида кадмия в организм крыс с питьевой водой, в концентрациях от 1 до 90 мкМ, достаточно для изменений показателей энцефалограммы сна, скоростной подвижности глаз и снижения локомоторной активности в наиболее активной фазе (ночное время). В то же время, в ходе наблюдения за поведением крыс в течение месяца, при хроническом воздействии более высоких концентраций $CdCl_2$ (100 мкМ в питьевой воде) выявлено, что показатели свободной подвижности как в темное, так и в светлое время суток остаются неизменными [5]. Такие результаты исследований еще раз подтверждают гипотезу, что ионы металлов в малой дозе могут иметь ограниченное действие на молекулярные и клеточные механизмы нервной системы. Известно, что глиальные клетки обладают высокими потенциальными возможностями для защиты от дли-

тельного воздействия неблагоприятных и токсичных факторов внешней среды. В частности, астроциты рассматриваются как один из ключевых гистотипов ЦНС, который поддерживает нейрональные функции в норме и обеспечивает выживание нейронов при действии различных патогенетических факторов.

В нервной ткани число глиальных клеток более чем в 5 раз превышает количество нейронов. Глиоциты не только выполняют структурную функцию, но и играют важную роль в нейротрансмиссии, контроле взаимодействия между метаболитами, поступающими в кровь, и клетками нервной системы [6]. Характерной чертой одного из типов клеток нейроглии – астроцитов – является их активация в ответ на повреждения различной природы. Астроцитарная активация, получившая название «реактивный астроглиоз», служит ранним сигналом клеточного ответа на повреждение, а специфический глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) – обязательный компонент промежуточных филаментов цитоскелета астроцитов, рассматривается как гистоспецифический маркер астроцитарных повреждений и используется в качестве чувствительного индикатора нейротоксичности [7].

В связи с этим, изучение молекулярных механизмов длительного воздействия низких доз ионов кадмия на цитоплазматические и цитоскелетные белки клеток ЦНС в процессе постнатального развития представляет особый интерес.

Целью данной работы было исследование возрастных особенностей хронического воздействия малых доз кадмия на распределение растворимой и филаментной форм глиального фибриллярного кислого белка и его полипептидных фрагментов в различных отделах головного мозга крыс в постнатальный период развития.

Объекты и методы исследований

В качестве тест-объекта использовались крысы линии Wistar в возрасте 20 суток, которые были разделены на контрольную и экспериментальную группы методом рандомизации. Контрольная группа животных ($n=36$) содержалась в условиях с приме-

нением стандартной диеты. При содержании экспериментальной группы животных ($n=36$) к стандартной диете в питьевую воду добавляли на протяжении 42-х дней (начиная с 28-го дня постнатального развития) хлорид кадмия, концентрация которого составляла 10 мкМ. Крысы находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения и соблюдением общего рациона. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. Эксперимент проводился в соответствии с «Положением об использовании животных в биомедицинских исследованиях» [8]. Крыс обеих групп декапитировали на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й дни постнатального развития (ПНД-28, ПНД-42, ПНД-56 и ПНД-70 соответственно) под слабым наркозом (изофуран). Из мозга выделяли три отдела: мозжечок, гиппокамп и кору больших полушарий головного мозга, которые в дальнейшем использовали для получения белковых фракций. С целью исследования локализации белков астроцитов, с помощью дифференцированного центрифугирования и применения солюбилизации белков с участием 4 М мочевины, были получены фракции, содержащие цитозольные (водорастворимые) и цитоскелетные (филаментные) белки. Для выделения белков использовали схему, которая была описана ранее [7]. Уровень общего белка в полученных фракциях определяли по методу Брэдфорд [9].

Содержание ГФКБ в отделах мозга определяли с помощью конкурентного твердофазного ингибиторного иммуноферментного анализа с использованием моноспецифических поликлональных антител против ГФКБ (Santa Cruze Biotechnology Inc., США), вторичных антикроличьих анти-IgG, меченных пероксидазой хрена (Sigma, США), и очищенного препарата ГФКБ в качестве калибратора стандарта (Boehringer Mannheim, Германия). Определение оптической плотности проводили с помощью ИФА-ридера Anthos 2010 (Финляндия) при 492 нм.

Электрофорез проводили в градиенте полиакриламидного геля (7-18%) в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия, как описано ранее [7]. Содержание интактного полипептида с молекулярной массой 49-46

кДа и состав полипептидных фрагментов ГФКБ определяли с помощью иммуноблоттинга.

Определение относительной интенсивности полипептидных зон выполняли с помощью обработки сканированных результатов иммуноблоттинга приложением Image2000 (Bio-Techne Corp.). Относительную количественную оценку содержания полипептидных фрагментов ГФКБ осуществляли путем сравнения интенсивности окраски соответствующих проб. Уровень конечных продуктов ПОЛ в гомогенатах отделов головного мозга измеряли с использованием тест-набора LPO-586 (Oxis, Int.Inc., USA) с помощью метода, который основан на реакции N-метил-2-фенилиндола с малоновым диальдегидом и 4-гидроксиалкенами.

Обработку полученных данных проводили методами математической статистики для малых выборок с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft® Excel 2000» (Microsoft®), «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc.). Относительное содержание ГФКБ выражали в виде средней величины $M \pm m$, достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($P < 0,05$) после проверки гипотез о нормальности распределения и различия между генеральными дисперсиями.

Результаты исследований

Сравнительный анализ содержания общего белка в цитозольных фракциях коры больших полушарий головного мозга, гиппокампа и мозжечка контрольной и экспериментальной групп животных показал прогрессивную положительную динамику на протяжении 6-ти недель исследования. Так, уровень водорастворимых белков в отделах головного мозга контрольной группы крыс увеличился в среднем на 37,8% (кора), 39,2% (мозжечок) и 41,0% (гиппокамп), а экспериментальной группы – на 31,7% (мозжечок), 39,0% (гиппокамп) и 39,8% (кора).

При определении содержания белков цитоскелетных фракций в тех же отделах головного мозга выявлена несколько иная зависимость. С 4-ой по 10-ую неделю развития контрольных животных максимальный рост уровня цитоскелетных белков наблю-

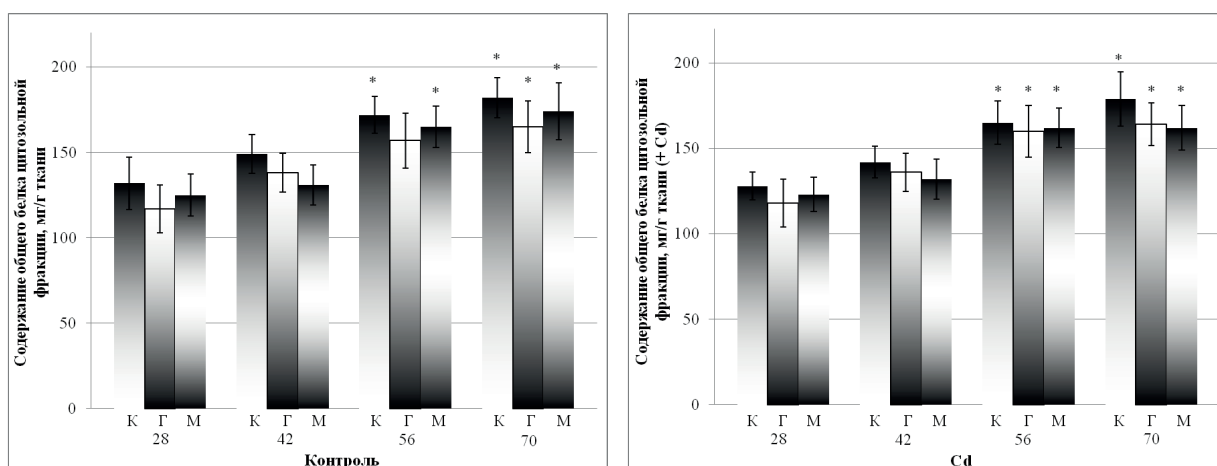


Рис. 1 - Содержание общего белка в цитозольных фракциях коры больших полушарий (К), гиппокампа (Г) и мозжечка (М) головного мозга крыс на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й день постнатального развития.

*Контроль – контрольные группы животных, n=9; Cd – экспериментальные группы животных, n=9; достоверность изменений относительно ПНД-28: * - P<0,05.*

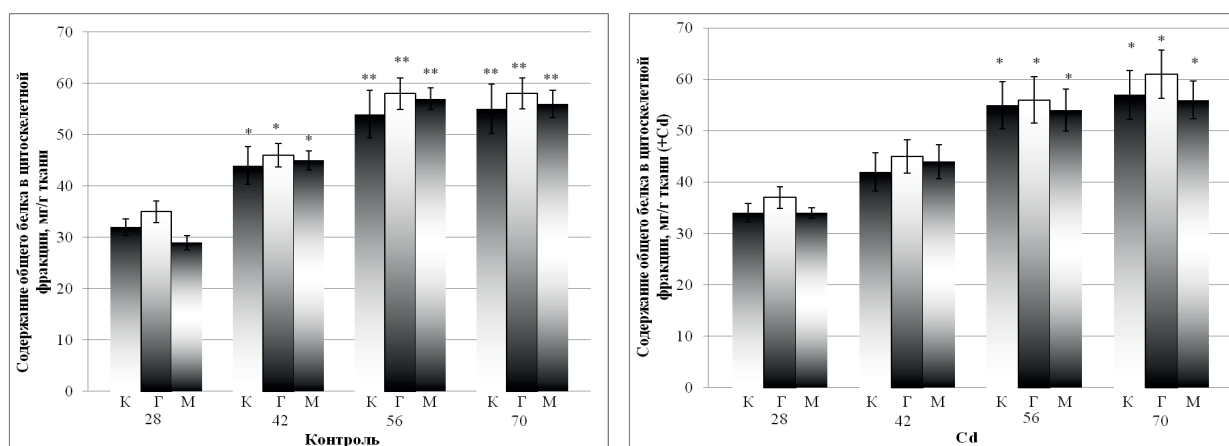


Рис. 2 - Содержание общего белка в цитоскелетных фракциях коры больших полушарий (К), гиппокампа (Г) и мозжечка (М) головного мозга крыс на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й день постнатального развития.

*Контроль – контрольные группы животных, n=9; Cd – экспериментальные группы животных, n=9; достоверность изменений относительно ПНД-28: * - P<0,05, ** - P<0,01.*

дался в мозжечке (в среднем на 93,1%), а минимальный – в гиппокампе (в среднем на 65,7%). Уровень содержания цитоскелетных белков коры больших полушарий на 70-ый день после рождения увеличился в среднем на 71,9%. В этот же период развития особей экспериментальной группы, получавших CdCl₂ с питьевой водой, содержание filamentных белков в мозжечке, гиппокампе и коре больших полушарий увеличилось в среднем на 64,7%, 64,9% и 67,6% соответственно.

Необходимо обратить особое внима-

ние на то, что при проведении сравнительного анализа изменений содержания общего белка в исследуемых отделах головного мозга контрольных и экспериментальных групп животных достоверных различий не выявлено. Результаты количественного определения общего белка цитозольных и цитоскелетных фракций в мозге крыс представлены на рис. 1–2.

При однотипности роста содержания общего белка в головном мозге контрольной и экспериментальной групп животных в процессе онтогенеза выявлены значитель-

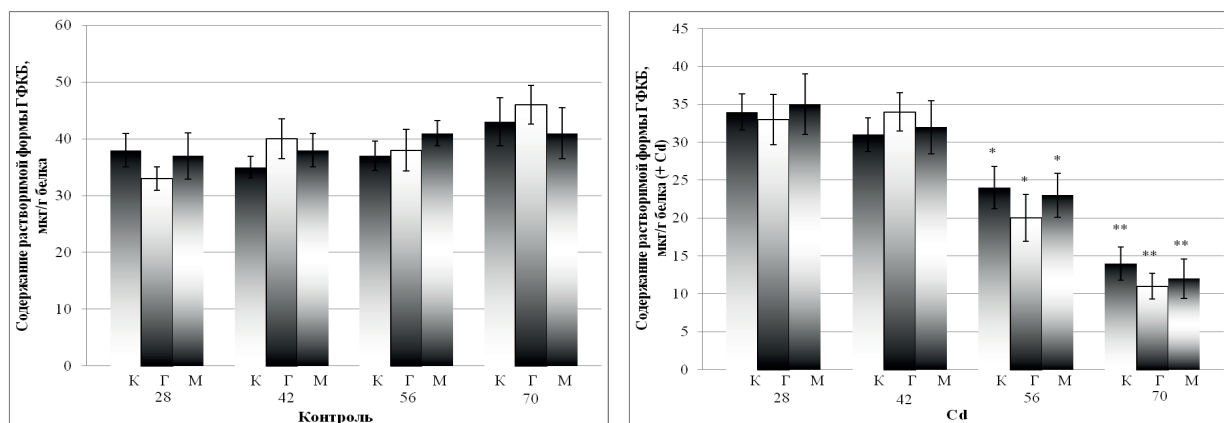


Рис. 3 - Сравнительное содержание растворимой формы ГФКБ в коре больших полушарий (К), гиппокампе (Г) и мозжечке (М) головного мозга крыс на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й день постнатального развития в стандартных условиях и при хроническом воздействии малых доз хлорида кадмия.

Контроль – контрольные группы животных, n=9; Cd – экспериментальные группы животных, n=9; достоверность изменений относительно ПНД-28: * - P<0,05, ** - P<0,01.

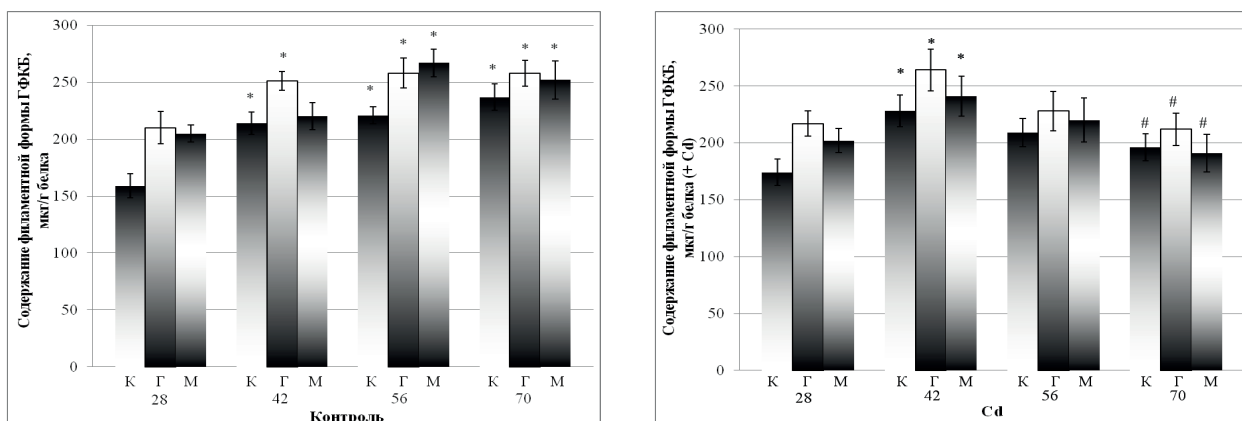


Рис. 4 - Сравнительное содержание филаментной формы ГФКБ в коре больших полушарий (К), гиппокампе (Г) и мозжечке (М) головного мозга крыс на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й день постнатального развития в стандартных условиях и при хроническом воздействии малых доз хлорида кадмия.

Контроль – контрольные группы животных, n=9; Cd – экспериментальные группы животных, n=9; достоверность изменений относительно ПНД-28: * - P<0,05; достоверность изменений относительно ПНД-42 # - P<0,05.

ные изменения экспрессии ГФКБ. Выявлено, что на фоне увеличения количества растворимого ГФКБ (рГФКБ) в исследуемых отделах головного мозга контрольной группы крыс хроническое действие малых доз ионов кадмия вызывает стабильное снижение содержания этой формы ГФКБ в коре больших полушарий, гиппокампе и мозжечке в течение всего периода развития животных. Результаты содержания цитозольной формы ГФКБ в отделах головного мозга контроль-

ной и экспериментальной групп животных в период с 28-го по 70-й день постнатального онтогенеза представлены на рис. 3.

В ходе проведенных исследований установлено, что динамика изменений содержания растворимой формы ГФКБ (в цитозольной фракции) в присутствии Cd²⁺ имеет реципрокный характер. Так, уже на 42-ой день экспозиции хлоридом кадмия снижение содержания рГФКБ составило в среднем 11,4%, 15,0% и 15,8% в коре головного моз-

га, гиппокампе и мозжечке соответственно (в сравнении с контролем). Наиболее существенное уменьшение этой формы ГФКБ было выявлено в головном мозге экспериментальных животных на 70-й день постнатального развития – в среднем на 67,4%, 70,7% и 76,1% в коре, мозжечке и гиппокампе соответственно.

По сравнению с содержанием ГФКБ цитозольной фракции, выявленные возрастные изменения филаментного ГФКБ (фГФКБ) носили более прогрессивный характер. В отличие от линейного спада содержания водорастворимого ГФКБ, ионы кадмия вызывали бифуркационные изменения экспрессии этого протеина глиальных промежуточных филаментов с максимумом на 14-й день воздействия (рис. 4).

Следует отметить, что выявленное снижение содержания филаментного глиального фибриллярного кислого белка менее значительно, чем рГФКБ. В сравнении с контролем содержание филаментной формы ГФКБ на 70-ый день постнатального развития составило в среднем 82,7% (кора), 82,2% (гиппокамп), 75,8% (мозжечок) от контрольных значений. Наиболее существенное уменьшение филаментной фракции ГФКБ выявлено в мозжечке (в среднем на 24,2%). Полученные результаты свидетельствуют о высокой стабильности промежуточных филаментов клеток нейроглии. В норме тренд увеличения содержания ГФКБ, характерный для раннего постнатального периода развития головного мозга, отражает характерные процессы формирования зрелых нейрональных и астроцитарных композиций в отделах головного мозга позвоночных. Учитывая, что в период постнатального развития грызунов наиболее интенсивный синаптогенез наблюдается в течение первых месяцев после рождения, поступательный рост содержания общего белка отражает процессы дифференциации клеток нервной ткани.

Немаловажно, что в мозге крыс филаментная форма ГФКБ в несколько раз преобладает над растворимой формой этого белка [11]. Рост количества фГФКБ свидетельствует об интенсивных процессах образования промежуточных филаментов и

разветвления отростков при формировании цитоскелетной сети астроцитов в период постнатального онтогенеза. Этот этап совпадает с началом самостоятельного питания, активного распознавания окружающей среды, формирования памятных следов и закреплением необходимых навыков. Наиболее значимо, что именно в раннем постнатальном периоде развития происходит интенсивное образование устойчивых и функционально значимых синапсов, для формирования которых участие астроцитов является обязательным, так как эти клетки обеспечивают их трофическую и структурную поддержку. В это время даже незначительные концентрации нейротоксинов могут индуцировать нарушения в формировании уникальных контактов зрелой нейрональной сети.

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что Cd^{2+} имеет выраженный ингибирующий эффект на экспрессию белка промежуточных филаментов астроцитов. Наиболее уязвимой для действия ионов кадмия является растворимая в буфере с низкой ионной силой форма ГФКБ, снижение содержания которой может быть как результатом угнетения биосинтеза, так и активацией протеолитических ферментов, в частности, ферментов семейства кальпаинов и/или каспаз. Очевидно, растворимые субъединицы ГФКБ гораздо доступнее для протеаз по сравнению с полипептидами этого белка, полимеризованными в филаменты. Учитывая, что после синтеза растворимые субъединицы промежуточных филаментов чрезвычайно быстро включаются в состав цитоскелетных структур [10], можно предположить, что ионы кадмия могут дополнительно инициировать снижение содержания цитозольной фракции ГФКБ за счет увеличения скорости их полимеризации.

На основании данных иммуноблоттинга можно заключить, что присутствие ионов кадмия не вызывает существенной деградации растворимого ГФКБ. Однако в отличие от рГФКБ, в образцах филаментной формы глиального фибриллярного кислого белка, присутствие полипептидных фрагментов с

молекулярной массой в диапазоне 46–35 кДа выявлено во всех исследованных отделах мозга крыс (рис.5)

Результаты иммуноблотинга указывают на существенную активацию протеолиза и цитоскелетных перестроек в головном мозге крыс при действии малых доз Cd^{2+} . Принимая во внимание, что чрезмерная экспрессия ГФКБ является надежным маркером астроглиоза, существенный рост содержания деградированных фрагментов филаментной формы этого протеина подтверждает протекание процесса реактивации астроцитов в ответ на повреждающее действие ионов кадмия.

Реакция астроцитов является важной составляющей клеточного ответа ЦНС на различные повреждения. На примере многочисленных экспериментальных моделей показано, что этот процесс характеризуется чрезмерной экспрессией ГФКБ при пролиферации и дифференциации астроцитов и тесно ассоциирован с оксидативным стрессом [11]. Роль оксидативного стресса, как одного из центральных механизмов нейротоксичности кадмия, подтверждают исследования с культурами клеток, показывающие, что процессы, индуцируемые ионами Cd^{2+} , могут быть в значительной степени компенсированы с помощью различных антиоксидантов [1]. Об устойчивом нарушении окислительно-восстановительного баланса и активации путей реактивного ответа клеток нервной ткани во всех исследованных отделах головного мозга крыс, получавших хлорид кадмия с питьевой водой, свидетельствуют результаты определения содержания конечных продуктов ПОЛ. Достоверное ($P < 0,05$) однотипное повышение (по сравнению с контролем) этого показателя генерации оксидативного стресса выявлено у экспериментальных животных на 56-й и 70-й день постнатального развития. Таким образом, одним из возможных механизмов индукции астроглиоза является рост генерации свободных радикалов вследствие хронических эффектов малых доз ионов кадмия.

В сравнении с кортикальными нейронами и микроглией, астроциты, как главные

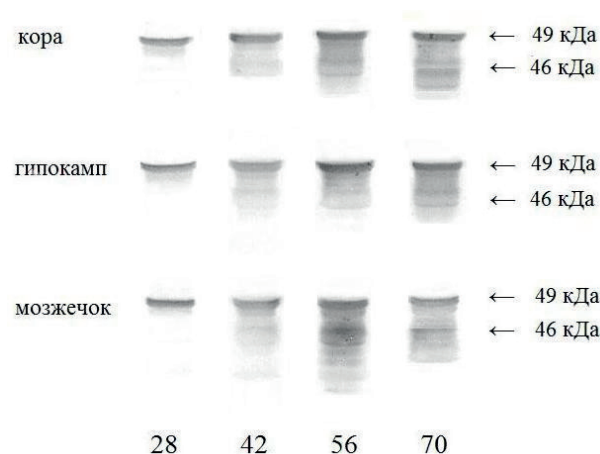


Рис. 5 - Иммуноблотинг цитоскелетных фракций белков головного мозга крыс на 28-й, 42-й, 56-й и 70-й день постнатального развития в стандартных условиях и при хроническом воздействии малых доз хлорида кадмия.

ЦНС-поддерживающие клетки, более резистентны к индуцированным ионами Cd^{2+} повреждениям. Более высокая устойчивость астроцитов к действию РСК, по сравнению с другими клеточными типами ЦНС, обеспечивается наличием в этих клетках мощных антиоксидантных систем защиты [12]. Однако феномен эксцитотоксичности может быть индуцирован присутствием кадмия и в астроцитах. Так, при кратковременном поступлении $CdCl_2$ в организм крыс с питьевой водой в течение 24 часов в концентрации 20 мкМ наблюдаются нарушения, которые сопоставимы с изменениями, выявленными при длительном влиянии низких доз кадмия (5 мкМ в питьевой воде). Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в этих случаях приводит к дополнительной генерации РСК и значительным митохондриальным повреждениям [12]. Важную роль в защите как астроцитов, так и ЦНС в целом играет экспрессия металлотioneинов, которая выражается в повышении их содержания в ответ на экспозицию ионами кадмия, что способствует удалению экзогенных тяжелых металлов из организма [13].

Известно, что в головном мозге млекопитающих идентифицировано несколько различных изоформ ГФКБ (α -, β -, κ -, δ - и ϵ -изоформа). Сравнительно недавно уста-

новлено, что комбинированное воздействие смеси солей мышьяка, свинца и кадмия, длительно поступающих в организм крыс с питьевой водой в период постнатального развития (до 60 дней), приводит к постепенному дифференциальному торможению экспрессии молекул мРНК, кодирующих различные изоформы ГФКБ астроцитов. Блокировка экспрессии гена ГФКБ в культуре первичных астроцитов сопровождается падением содержания растворимой формы ГФКБ при увеличении количества апоптических астроцитов [14]. Такие данные позволяют предположить, что аккумуляция тканями тяжелых металлов инициирует изменения в соотношении изоформ ГФКБ в головном мозге, а угнетение экспрессии рГФКБ индуцирует апоптоз зрелых астроцитов крыс. Специфичность таких эффектов обусловлена особенностями отделов мозга, что влияет на функциональные свойства, как отдельных участков нервной системы, так и ЦНС в целом.

Результаты проведенных исследований подтверждают влияние малых доз ионов кадмия на состояние цитоскелета астроцитов и вовлечение этого металла в процессы цитоскелетных модификаций в ходе раннего постнатального развития. Угнетение функций астроцитов в раннем онтогенезе может быть основной причиной отсроченных патогенетических событий [15]. Так, при некоторых нейродегенеративных заболеваниях изменения морфологии и плотности астроцитов головного мозга предшествуют клиническим симптомам, которые проявляются намного позже астроцитарных нарушений [16]. На основании этих данных можно предположить, что патогенез астроцитов служит инициатором каскадных изменений молекулярных и клеточных механизмов, ведущих к нарушению нормального процесса образования нейрональных ансамблей и формирования зрелой ЦНС. Однако механизмы участия астроцитов в развитии отдаленных функциональных нарушений нервной системы, индуцированных интоксикацией ионами кадмия, нуждаются в дальнейшем изучении.

Выводы

Динамика экспрессии ГФКБ в условиях воздействия хлорида кадмия (10 мкМ в питьевой воде) свидетельствует о том, что астроциты принимают активное участие в защитных реакциях организма. Интоксикация малыми дозами Cd^{2+} приводит к достоверному ($P < 0,01$) реципрокному уменьшению растворимой формы ГФКБ, бифуркационным изменениям филаментной формы ГФКБ и увеличению полипептидных фрагментов этого протеина в коре больших полушарий, гипокампе и мозжечке головного мозга, что указывает на развитие клеточного ответа астроцитов. Полученные данные подтверждают участие промежуточных филаментов астроцитарного цитоскелета в процессах, обуславливающих особенности нейротоксических эффектов кадмия и риск нейродегенеративных нарушений.

Библиографический список

1. Im, J.Y. Cadmium-induced astroglial death proceeds via glutathione depletion / J.Y. Im, S.G. Paik, P.L. Han // J. Neurosci Res. – 2006. - V. 83(2). – P. 301-308.
2. Rai, N.K. Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina / N.K. Rai, A. Ashok, A. Rai et. al. // J. Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. - V. 273(2). – P. 242-58.
3. Gerspacher, C. The effect of cadmium on brain cells in culture / C. Gerspacher, U. Scheuber, G. Schiera et. al. // Int. J. Mol. Med. – 2009. - V. 24(3). – P. 311-318.
4. Sarchielli, E. Cadmium induces alterations in the human spinal cord morphogenesis / E. Sarchielli, S. Pacini, G. Morucci et. al. // Biometals. – 2012. – V. 25(1). – P.63-74.
5. Unno, K. Acute enhancement of non-rapid eye movement sleep in rats after drinking water contaminated with cadmiumchloride / K. Unno, K. Yamoto, K. Takeuchi et. al. // J. Appl. Toxicol. – 2014. - V. 34(2). – P. 205-213.
6. Sofroniew, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation / M.V. Sofroniew // Trends. Neurosci. – 2009. – V. 32(12). – P. 638-647.
7. Nedzvetsky, V.S. Effects of vitamin E against aluminum neurotoxicity in rats / V.S.

Nedzvetsky, M. Tuzcu, A. Yasar et. al. // Biochemistry (Moscow). – 2006. – V. 71(3). – P. 239-244.

8. Этика врача и права человека: положения о использовании животных в биомедицинских исследованиях // Экспериментальная и клеточная физиология и биохимия. – 2003. – Том 22, № 2. – С. 108–109.

9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.

10. Eng, L.F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / L.F. Eng, R.S. Ghirnikar, Y.L. Lee // Neurochem. Res. – 2000. – V. 25(9-10). – P. 1439-1451.

11. Baydas, G. Melatonin protects the central nervous of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis / G. Baydas, R.J. Reiter, V.S. Nedzvetskii // Toxicology Letters. – 2003. – V. 137. – P.169-174.

12. Yang, C.S. Inhibition of cadmium-induced oxidative injury in rat primary astrocytes

by the addition of antioxidants and the reduction of intracellular calcium / C.S. Yang, B.C. Tzou, Y.P. Liu et. al. // J. Cell. Biochem. – 2008. – V. 103(3). – P. 825-34.

13. Cadmium chloride (CdCl₂)-induced metallothionein (MT) expression in neonatal rat primary astrocyte cultures / L. Rising, D. Vitarella, H.K. Kimelberg, M. Aschner // Brain Res. – 1995. – V. 678(1-2). – P. 91-98.

14. Rai, A. Down-regulated GFAP α : a major player in heavy metal induced astrocyte damage / A. Rai, S.K. Maurya, R. Sharma et. al. // Toxicol. Mech. Methods. – 2013. – V. 23(2). – P.99-107.

15. Влияние низких доз ионов Pb²⁺ на состояние цитоскелета астроцитов мозга крыс в раннем постнатальном периоде / Е.В. Сухаренко, И.В. Прищепа, В.С. Недзвецкий, В.И. Максимов // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные – 2015. – №2. – С. 10-13.

16. Notarachille, G. Heavy metals toxicity: effect of cadmium ions on amyloid beta protein 1-42. Possible implications for Alzheimer's disease / G. Notarachille, F. Arnesano, V Calo et. al. // Biometals. – 2014. – V. 27(2). – P.371-388.