

УДК 577.15.04:574.5:591.05:592

ВПЛИВ ПЛЮМБУМУ НА ЕКСПРЕСІЮ ПРОТЕЇНІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ (HSP70 і HSC70) У ЗЯБРАХ ТА ПЕЧІНЦІ КОРОПА

М. Онисковець, к. б. н.

ORCID ID: 0000-0002-4566-1000

Н. Лопотич, к. с.-г. н.

ORCID ID: 0000-0002-3319-0723

Львівський національний аграрний університет

<https://doi.org/10.31734/agronomy2019.01.272>

Онисковець М., Лопотич Н. Вплив Плюмбуму на експресію протеїнів теплового шоку (hsp70 і hsc70) у зябрах та печінці коропа

Протеїни білкового шоку належать до природних біомаркерів, які є важливими показниками діагностики хвороб тварин та / або інструментом аналізу впливу на організм чинників, що погіршують середовище існування. Забруднення води важкими металами, особливо Плюмбумом (навіть у невеликих кількостях), є дуже небезпечним і негативно впливає на організм риби. Аналіз токсичного впливу іонів Плюмбуму на рівень експресії таких протеїнів теплового шоку, як HSP70 та HSC70 в печінці та зябрах лускатого коропа, був основною метою нашого дослідження. Такі дослідження є вкрай актуальні та важливі для оцінки здоров'я риб у рамках моніторингу водних біоценозів.

У дослідженнях використовували дворічних особин коропа лускатого масою 270–350 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л. До кожної експериментальної групи вводили по 7 особин. Необхідні рівні концентрацій важких металів у всіх серіях експерименту були змодельовані додаванням у басейн з рибою 0,2; 0,5 і 5 мг/дм³ Плюмбуму (у вигляді Pb (CH₃COO)₂×3H₂O). Ці концентрації відповідають 2-му, 5-му та 50-му індексам граничного порогового значення Плюмбуму у водному середовищі. Концентрацію HSP70 і HSC70 визначали дот-блот аналізом за рахунок застосування моноклональних антитіл проти протеїнів теплового шоку [5A5] (ab2787) (Abcam, США) і [1B5] (ab19136) (Abcam, США) та поліклональних козячих антимишачих антитіл, кон'югованих із лужною фосфатазою («Tropix», США).

Методом імуноблотингу було виявлено дозозалежне збільшення протеїнів HSP70 у печінці та зябрах (p < 0,001) усіх дослідних груп риб. Водночас істотних змін експресії протеїнів HSC70 не встановлено. Це свідчить про те, що стрес-протеїни є чутливими маркерами токсичних ефектів надмірної концентрації Плюмбуму.

Ключові слова: протеїни теплового шоку, HSP70, HSC70, дот-блот аналіз, стрес, Плюмбум, зябра, печінка, короп.

Onyskovets M., Lopotich N. Influence of the lead on the expression of heat shock proteins (hsp70 and hsc70) in liver and gills of the carp

Heat Shock Proteins belong to the natural biomarkers, which are important indicators for animal diseases diagnostics and /or instrument of analyzing the effects on organism of the factors deteriorating the habitat. The contamination of water by heavy metals, especially by lead (even in small quantities), is very dangerous and has adverse effect on fish organism. The analysis of toxic effects of the lead ions on the level of expression of such heat shock proteins as HSP70 and HSC70 family in liver and gills of the scaly carp was the main goal of our investigation. Such investigations are really actual and important for estimation of the fishes health during water biocenosis monitoring.

Necessary levels of heavy metals concentrations in all series of experiment were simulated by adding in the water environment of the pool with fish 0,2; 0,5 and 5 mg/dm³ of lead (in the form of Pb(CH₃COO)₂×3H₂O). Those concentrations correspond to the 2nd, 5th and 50th-fold indices of the threshold limit value of lead in water environment. Concentration of HSP70 and HSC70 was determined by the dot-blot-analysis due to application of monoclonal antibodies against heat shock proteins [5A5] (ab2787) (Abcam, USA) and [1B5] (ab19136) (Abcam, USA) and polyclonal goat antimice antibodies, conjugated with alkaline phosphatase («Tropix», USA).

The significant dose-dependent increase (p < 0,001) in all experimental groups of HSP70 concentrations in liver and gills has been detected, applying dot-blot analysis. At the same time, significant changes in expression of HSC70 protein have not been established. It is the evidence that stress-proteins are the sensitive markers of toxic effects of excessive concentration of lead.

Key words: heat shock proteins, HSP70, HSC70, stress, lead, dot-blotting, liver, gills, carp.

Постановка проблеми. Протеїни теплового шоку (heat shock protein, HSP) становлять собою родину висококонсервативних протеїнів, які необхідні клітині в усіх процесах її життє-

діяльності, включаючи адаптацію до величезного числа цитотоксичних чинників як ксенобіотичного, так і природного походження [3; 4]. HSP належать до природних біомаркерів, і визначення

їхньої кількості в тканинах або клітинах стає однією з цілей діагностики поширених захворювань людини й тварин і/або аналізу впливу чинників, що порушують природне середовище проживання. Актуальність таких досліджень визначається значною мірою зростанням антропогенного впливу на природні водойми, в яких для риб як кінцевої ланки трофічного ланцюга, існує значна токсикологічна загроза [6; 7; 8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Найбільш вивченою родиною протеїнів теплового шоку є родина HSP70, що охоплює індукований стресовими чинниками HSP70 і конститутивно експресований клітинами HSC70. Експресія протеїнів теплового шоку HSP70 була описана в різноманітних клітинних лініях, тканинах та органах низки організмів [1; 3]. До найвідоміших індукторів експресії HSP належать гіпертермія (нагрівання клітин або організму до сублетальної температури), важкі метали, окиснювальний стрес, органічні розчинники, деякі віруси та отрути [2]. Щодо впливу іонів Плюмбуму на протеїни теплового шоку риб даних є недостатньо, хоча ці протеїни становлять собою один із найхарактерніших маркерів токсичної інтоксикації та загального стресу організму [5]. Такі дослідження є вкрай актуальними і необхідними для оцінки стану здоров'я риб у рамках моніторингу водних біоценозів [1].

Постановка завдання. Метою нашого дослідження було з'ясувати вплив Плюмбуму на рівень експресії протеїнів теплового шоку родини HSP70 і HSC70 у зябрах та печінці коропа лускатого.

Виклад основного матеріалу. У дослідженнях використовували дворічних особин коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 270–350 г. Досліди проводили в резервуарах об'ємом 200 л. До кожної експериментальної групи входило по 7 особин. Необхідні рівні концентрацій важкого металу в усіх серіях експерименту були змодельовані додаванням у водне середовище 0,2; 0,5 і 5 мг/дм³ Плюмбуму (у вигляді Pb(CH₃COO)₂ × 3H₂O). Ці концентрації відповідають 2-му, 5-му та 50-му ГДК Плюмбуму у водному середовищі. Риб витримували 96 годин у середовищі з додаванням Pb(CH₃COO)₂. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні 18–20 °С. Відбирали тканини печінки та зябра риб, які промивали фізіологічним розчином і заморожували у рідкому азоті.

Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі буферу для лізування, рН

7,4 (10 % N–лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N–етилмалеїмід в 0,01 M Na– фосфатному буфері, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїназ – Sigma, ФРН). Далі зразки центрифугували за 5200 g упродовж 5 хв за 4 °С. У лізатах вимірювали концентрацію протеїнів методом Лоурі. Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального протеїну зразки розводили буфером, рН 7,4 (25 мМ Tris–HCl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl). На нітроцелюлозну мембрану (Millipore) наносили лізат об'ємом 3 мкл з однаковим загальним вмістом протеїну 1–5 мкг. Для виявлення фонового свічення на мембрану наносили буфер для лізування та буфер для розведення зразків. Мембрану блокували упродовж 1 год у 5 %-му розчині казеїну.

Після нанесення контрольних і дослідних зразків мембрану інкубували з антитілами до досліджуваних протеїнів [5A5] (ab2787) (Abcam, USA) і [1B5] (ab19136) (Abcam, USA) у ЗФРТ 90 хв та поліклональними козячими антимішачими антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Tropix, США) – 1:5000 у ЗФРТ 30 хв. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази – CDP–Star (Tropix, Велика Британія). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявки плівок (Kodak). Обробку зображень для отримання цифрових значень здійснювали за допомогою пакета програм GelPro (Version 3.1, USA). Вміст протеїнів теплового шоку виражали в умовних одиницях (1 ум. од. = 1 піксель на кв. дюйм).

Проведені раніше дослідження показали, що підвищені концентрації Плюмбуму спричинюють зміни у функціональному стані клітин та органів коропа лускатого. Найвагоміші зміни було відмічено у печінці та зябрах риб. Тому на наступному етапі було досліджено вплив Плюмбуму на рівень протеїнів теплового шоку, які є універсальними репортерами відповіді організму на стрес.

Експресію протеїнів визначали за допомогою дот-блот-аналізу (або точкової гібридизації) з допомогою специфічних антитіл. В основі методу лежить імунологічне виявлення імобілізованого на нітроцелюлозній мембрані антигену. Виявлення комплексів антиген–антитіло здійснюється з використанням інших антитіл, які кон'юговані з ензимом. Після додавання субстрату проходить реакція, що супроводжується свіченням ділянок, які містять комплекс детектованого протеїну з антитілами, яке реєструють на рентгенівській плівці.

Методом дот-блот аналізу у зябрах контрольної групи риб було визначено незначну кіль-

кість HSP70, тоді як за умов впливу 2 ГДК Плюмбуму відбувалося збільшення рівня експресії досліджуваного протеїну на 80 % ($p < 0,001$). Концентрації, що еквівалентні 5 та 50 ГДК Плюмбуму призводили до вірогідного зростання досліджуваного показника більше, ніж у 100 разів (див. табл., рис.).

У печінці досліджуваних риб визначили, що 0,2 мг/дм³ Плюмбуму призводили до детектування протеїнів теплового шоку на рівні $19,25 \pm 2,12$ у. о., а 0,5 та 5 мг/дм³ спричинили значне зростання вмісту HSP70 до $65,27 \pm 8,35$ і $252,28 \pm 18,64$ у. о., що відповідно у 26 і 100 разів більше від контролю.

Таблиця

Вміст HSP70 та HSC70 у печінці та зябра корона лускатого за дії Плюмбуму, ум. од. (M±m)

		HSP70		
Тканина	Контроль	Концентрація Pb ²⁺		
		(2 ГДК)	(5 ГДК)	(50 ГДК)
Печінка	2,56±0,32	19,25±2,12*	65,27±8,35*	252,28±18,64*
Зябра	0,95±0,09	9,27±1,22*	102,31±2,95*	135,47±9,74*
		HSC70		
Печінка	385,23±29,87	348,25±30,21	321,08±22,58	345,87±24,79
Зябра	120,32±14,31	112,41±18,05	139,58±15,75	125,96±10,48

Примітки: 1) * – $p < 0,001$ – різниця вірогідна порівняно з контролем;

2) 1 ум.од. = 1 піксель на кв. дюйм.

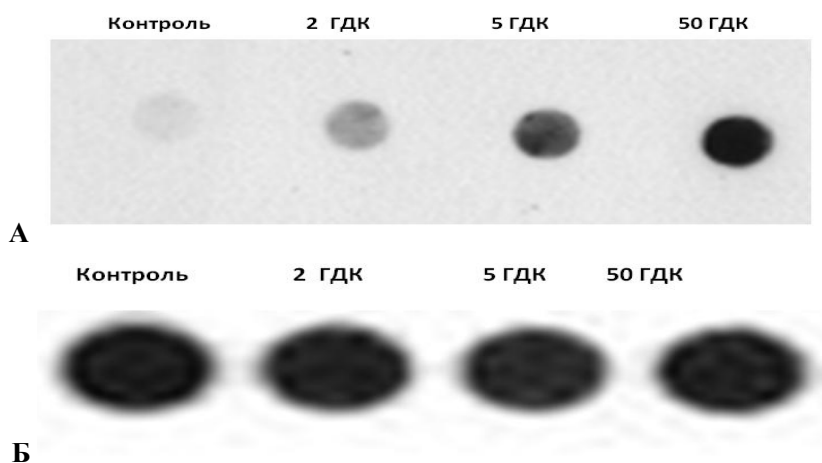


Рис. Дот-блот аналіз вмісту протеїнів (А) HSP70 і (Б) HSC70 у печінці корона лускатого за дії йонів Плюмбуму

У контрольній групі було детектовано незначний рівень HSP70, а усі досліджувані концентрації йонів Плюмбуму дозозалежно збільшували вміст HSP70, причому найвищий рівень експресії цього протеїну було відмічено за дії 5мг/дм³. Якщо ж говорити про HSC70, то для печінки було відмічено аналогічну із зябрами картину, коли жодна з концентрацій йонів Плюмбуму не мала істотного впливу на рівень експресії згаданого протеїну (див. рис.).

Отже, у результаті наших досліджень було виявлено підвищення вмісту протеїну HSP70 за дії усіх концентрацій Плюмбуму на тлі повної відсутності змін в експресії HSC70. Це можна

пояснити тим, що HSP70 належить до тих протеїнів теплового шоку, які відповідають на широкий спектр стресових чинників і, зокрема, на дію важких металів [3], тоді як HSC70, ймовірно, залучений до специфічніших механізмів відповіді на детерміновані чинники стресового впливу. Проте основним моментом нашого дослідження є потенційна можливість використання протеїнів теплового шоку як специфічних маркерів токсичної дії Плюмбуму.

Висновки. Встановлено вірогідне зростання експресії HSP70 у зябрах та печінці корона лускатого за дії усіх концентрацій Плюмбуму.

Водночас жодна із застосованих концентрацій йонів Плюмбуму не викликала істотних змін в експресії HSC70. На підставі отриманих даних висувається припущення про наявність кореляції між станом цілого організму і вмістом протеїнів HSP70 та HSC70. Передбачається, що HSP70 передусім необхідний для захисту від чинників, які викликають клітинний стрес, а протеїн HSC70 є незамінним для формування клітинної адаптації.

Бібліографічний список

1. Efremova S. M., Margulis B. A., Guzhova I. V., Itskovich V. B., Lauenroth S., Müller W.E. Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant. *Aquat. Toxicol.* 2002. Vol. 57. P. 267–280.
2. Evdonin A., Medvedeva N. The extracellular heat shock protein 70 and its functions. *Cytology.* 2009. Vol. 51, № 2. P. 130–137.
3. Dzaman-Serafin S., Telatyńska-Mieszek B., Ciechanowski K. Heat shock proteins and their characteristics. *Pol. Merkur Lekarski.* 2005. Vol. 19, №110. P. 215–219.
4. Kosakivska I. V., Golovyanko I. V. The role of heat shock proteins in adaptation of plants to stresses. *Physiology and biochemistry of cultivated plants.* 2007. Vol. 39. P. 187–199.
5. Mayer A. B. Hsp70 chaperone: cellular function and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. Vol. 62. P. 670–684.
6. Needleman H. L. Lead poisoning. *Annual Review of Medicine.* 2004. Vol. 55, № 1. P. 209–222.
7. Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases.* 2012. Vol. 35, № 2. P. 83–108.
8. Witeska M. Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals. *Electr. Journal Ichthyol.* 2005. Vol. 3, № 1. P. 35–41.

Стаття надійшла 02.05.2019.