

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 И HSC70 В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ *CYPRINUS CARPIO L.*

М.Я. Онисковец, В.В. Снитинский

Львовский национальный аграрный университет, Львов, Украина
e-mail: onyskovets_m@mail.ru

Введение

Белки теплового шока (heat shock protein, HSP) представляют собой семейство высококонсервативных внутриклеточных белков, необходимых для протекания всех процессов жизнедеятельности, включая адаптацию к огромному числу цитотоксических факторов, как ксенобиотического, так и природного происхождения [1, 2, 3]. Наиболее изученным семейством белков теплового шока является семейство HSP70, которое включает индуцированный стрессовыми факторами HSP70 и конститутивный экспрессированный клетками HSC70 [4, 5]. Экстремально высокая консервативность аминокислотной последовательности и сходство во вторичной и третичной структурах делает указанное семейство белков уникальным [1]. К числу наиболее известных индукторов экспрессии белков теплового шока относятся гипертермия (нагрев клеток или организма до сублетальной температуры), тяжелые металлы, окислительный стресс, органические растворители, некоторые вирусы и яды [3, 5]. Белки HSP70 входят в число природных биомаркеров, и определение их количества в тканях или клетках становится целесообразным для диагностики распространенных заболеваний человека и животных и/или анализа влияния факторов, нарушающих естественную среду обитания. Актуальность таких исследований определяется в значительной степени ростом антропогенного воздействия на природные водоемы, в которых для рыб, являющихся конечным звеном трофической цепи, существует значительная токсикологическая угроза [6, 7]. Известно, что наибольшую опасность представляет загрязнение водоемов тяжелыми металлами, и в первую очередь, свинцом, который даже в сравнительно малых количествах может негативно влиять на организм рыб [8, 9].

Целью исследования было изучить влияние ионов свинца на уровень экспрессии белков теплового шока семейства HSP70 в тканях головного мозга карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio L.*).

Методы исследования

В исследованиях использовали двухлетних особей карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio L.*) массой 270–350 г, которых вылавливали из прудов Львовской Исследовательской станции Института рыбного хозяйства. Опыты проводились в аквариумах объемом 200 л, в которые размещали по 3 особи. Проводили постоянную аэрацию и поддерживали температурный режим воды на уровне 18–20°C. Предварительно животных адаптировали к лабораторным условиям в течение 3 суток. Эксперименты осуществляли с соблюдением требований «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1985) [10].

Необходимые концентрации ионов свинца во всех сериях опытов создавались путем внесения в водную среду соответствующих его концентраций – 0,2; 0,5 и 5 мг/л, что соответствует 2, 5 и 50 предельно допустимым концентрациям (ПДК) $Pb(CH_3COO)_2$. Подопытные группы рыб подвергались воздействию ионов свинца на протяжении 96-ти часов. Контрольные показатели получали от подопытных особей карпа чешуйчатого, которые находились в водной среде без добавления ионов свинца. После декапитации животных, отделяли головной мозг, промывали его физиологическим раствором и использовали в дальнейших исследованиях.

Образцы тканей головного мозга рыб лизировали в десятикратном объеме буфера для лизиса, pH 7,4 (10% N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенилметилсульфонилфторид, 10 мкМ N-этилмалеимид в 0,01 М Na-фосфатном буфере, 0,001% коктейль ингибиторов протеиназ – Sigma, USA). Далее образцы центрифугировали при 5200 г в течение 5 мин. Концентрацию белка в лизатах тканей измеряли методом Лоури. Для выравнивания объемов и концентраций общего белка образцы разводили буфером для разведения образцов, pH 7,4 (25 мМ Трис–HCl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl). На нитроцеллюлозную мембрану (Millipor)

наносили лизат объемом 3 мкл с одинаковым общим содержанием белка. Для выявления фонового свечения на мембрану наносили буфер для лизиса и буфер для разведения образцов. Мембрану блокировали 1 час в 5% растворе казеина. После нанесения контрольных и опытных образцов мембрану инкубировали с антителами к белкам теплового шока [5A5] (ab2787) (Abcam, USA) и [1B5] (ab19136) (Abcam, USA) в PBS на протяжении 90 мин и поликлональными козыми антителами, меченные щелочной фосфатазой (Tropix, США) – 1:5000 в PBS 30 мин. Детекцию иммунных комплексов осуществляли с использованием коммерческого раствора субстрата для щелочной фосфатазы – CDP-Star (Tropix, Великобритания). Визуализацию проводили с помощью ECL-детекции с использованием рентгеновской пленки HyperFilm (Amersham, США) и набора для проявки пленок (Kodak). Обработку изображений для получения цифровых значений осуществляли с помощью пакета программ GelPro (Version 3,1, USA). Содержание белков теплового шока выражали в условных единицах (1 усл. ед.=1 пиксель на кв. дюйм).

Результаты исследований подвергали статистическому анализу. Обработку проводили с помощью программы Statistica с использованием t-коэффициента Стьюдента. Уровень достоверности полученных результатов устанавливали при $p \leq 0,05-0,001$.

Результаты и обсуждение

HSP70 являются одними из основных систем контроля качества белков и защиты клеток и организмов от различных повреждающих факторов. Благодаря шаперонной активности два члена семейства HSP70 – конститутивный (HSC70) и индуцибельный (HSP70) – участвуют в процессах фолдинга и рефолдинга полипептидов, ускорении транслокации белков через мембраны, а также в протеолитической деградации нестабильных белков, сборке и разборке белковых комплексов [11, 12].

Как известно из литературных источников, экспрессия белков теплового шока HSP70 была описана в головном мозге широкого ряда организмов. Экспрессия HSP70 при стрессе увеличивается в клетках глии, в нейронах, в пре- и пост-синаптических элементах, тогда как содержание HSC70 в нервной ткани животных высокое в не стрессовых условиях и не возрастает после стресса [13].

В результате проведенных исследований было выявлено незначительное количество белка HSP70 в головном мозге контрольной группы животных, а доза 2 ПДК ионов свинца сопровождалась достоверным увеличением уровня экспрессии исследуемого белка почти в 9 раз (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание белков HSP70 и HSC70 в мозге карпа чешуйчатого при воздействии ионов свинца, усл. ед. ($M \pm m$; $n=3$)

Показатель	Контроль	Концентрация ионов свинца		
		0,2 мг/л (2 ПДК)	0,5 мг/л (5 ПДК)	5 мг/л (50 ПДК)
HSP70	0,62±0,03	5,49±0,48*	12,29±1,85*	19,32±3,05*
HSC70	186,47±19,52	159,96±21,22	195,34±25,36	170,21±14,97

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$.

В условиях экспозиции рыб с 5 ПДК ионов свинца содержание белка HSP70 достоверно возросло более чем в 19 раз, по сравнению с контрольной группой животных. Высокий уровень экспрессии белка HSP70 (19,32±3,05 усл. ед.) было зафиксировано в мозге рыб при действии дозы свинца в 5 мг/л, что эквивалентно 50 ПДК ионов свинца (рисунок 1).

Исследование влияния ионов свинца на уровень белка HSP70 показало дозозависимое повышение содержания белка HSP70 в головном мозге *Cyprinus carpio* L. при воздействии всех исследуемых концентраций ионов свинца, по сравнению с контрольными значениями (таблица 1 и рисунок 1).

В то же время, при проведении оценки уровня экспрессии конститутивного белка теплового шока HSC70 в мозге карпа чешуйчатого, не определено достоверных изменений при действии различных концентраций ионов свинца, относительно контрольной группы рыб. Так, в ходе анализа, максимальное содержание (195,34±25,36 усл. ед.) белка HSC70 было определено в условиях экспозиции исследованных рыб с 5 ПДК ионов свинца. Как видно из рисунка 2 (фото репрезентативного дот-блот анализа) при воздействии дозы в 0,2 и 5 мг/л ионов свинца существенных изменений в экспрессии данного белка в представленных образцах не установлено.

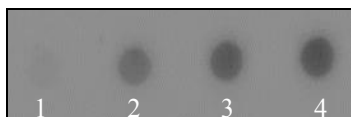


Рисунок 1 – Дот-блот анализ содержания белка HSP70 в мозге карпа чешуйчатого при действии ионов свинца: 1 – контроль; 2 – 2 ПДК; 3 – 5 ПДК; 4 – 50 ПДК

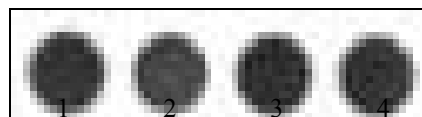


Рисунок 2 – Дот-блот анализ содержания белка HSC70 в мозге карпа чешуйчатого при действии ионов свинца: 1 – контроль; 2 – 2 ПДК; 3 – 5 ПДК; 4 – 50 ПДК

Таким образом, результаты дот-блот анализа позволили установить достоверное повышение уровня экспрессии белков HSP70 в тканях головного мозга опытной группы рыб при действии концентраций свинца, эквивалентных 2, 5, 50 ПДК. В то же время, ни одна из применяемых доз ионов свинца не вызвала существенных изменений ($p > 0,05$) в экспрессии конститутивного белка HSC70 во всех представленных образцах *Cyprinus carpio* L., относительно контрольной группы рыб. Это может объясняться тем, что HSP70 относится к тем белкам теплового шока, которые являются универсальными репортерами ответа организма на стресс и отвечают на широкий спектр стрессовых факторов и, в частности, на действие тяжелых металлов [4, 5]. Функция HSC70 остается до конца не исследованной, возможно этот белок вовлечен в более специфические механизмы ответа на детерминированные факторы стрессового воздействия, в частности – в формирование клеточной адаптации [3]. Надо отметить, что представленные выше данные свидетельствуют о потенциальной возможности использования белков теплового шока в качестве специфических маркеров токсического воздействия свинца. С этой целью можно использовать как HSP70, так и его комбинацию с HSC70: когда рост экспрессии первого и отсутствие изменений в уровне второго белка может быть подтверждающим фактором токсического влияния свинца на организм животных.

Выводы

Было установлено значительное повышение уровня белка теплового шока HSP70 в тканях головного мозга карпа чешуйчатого при воздействии концентраций свинца, эквивалентных 2, 5, 50 ПДК. В то же время, ни одна из применяемых концентраций ионов свинца не вызвала существенных изменений в экспрессии белка HSC70. На основании полученных данных можно предположить о наличие корреляционной связи между состоянием всего организма и содержанием белков HSP70 и HSC70. Предполагается, что HSP70, в первую очередь, необходим для защиты от факторов, вызывающих клеточный стресс, а белок HSC70 незаменим для формирования клеточной адаптации.

Список литературы

1. Центральные эффекты белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа / Л.И. Андреева [и др.] // Психофармакология и биологическая наркология. – 2005. – Т 5, № 1. – С. 794–803.
2. Kosakivska, I.V. The role of heat shock proteins in adaptation of plants to stresses / I.V. Kosakivska, I.V. Golovyanko // Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii. – 2007. – Vol. 39. – P. 187–199.
3. Маргулис, Б.А. Белки стресса в эукариотической клетке / Б.А. Маргулис, И.В. Гужова // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 4. – С. 323–342.
4. Евдонин, А.Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А.Л. Евдонин, Н.Д. Медведева // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 2. – С. 130–137.
5. Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant / S.M. Efremova [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2002. – Vol. 57. – P. 267–280.
6. The relative importance of water and food as cadmium source to *Daphnia magna* Straus / C. Barata [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2002. – Vol. 61. – P. 143–154.
7. Oliva-Teles, A. Nutrition and health of aquaculture fish / A. Oliva-Teles // Journal of Fish Diseases. – 2012. – Vol. 35, № 2. – P. 83–108.
8. Needleman, H.L. Lead poisoning / H.L. Needleman // Annual Review of Medicine. – 2004. – Vol. 55 (1). – P. 209–222.
9. Witeska, M. Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals / M. Witeska // Electr. J. Ichthyol. – 2005. – Vol. 3, № 1. – P. 35–41.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg: Council of Europe, 1986. – P. 52.
11. Hartl, F.U. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein / F.U. Hartl // Science. – 2002. – Vol. 295 (5561). – P. 1852–1858.
12. Mayer, A.B. Hsp70 chaperone: cellular function and molecular mechanism / A.B. Mayer, B. Bukau // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62. – P. 670–684.
13. Chen, S. Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative diseases / S. Chen, I.R. Brown // Cell Stress Chaperones. – 2007. – Vol. 12. – P. 51–58.