

**ВПЛИВ СВИНЦЮ НА ЕКСПРЕСІЮ БІЛКІВ ТЕПЛОВОГО ШОКУ Hsp70
І Hsc70 У ПЕЧІНЦІ ТА ЛЕЙКОЦИТАХ КОРОПА**

У статті наведено результати досліджень рівня експресії білків теплового шоку родини Hsp70 у печінці та клітинах крові коропа лускатого за умов отруєння солями свинцю. Методом імуноблотингу було виявлено значне зростання білка Hsp70, тоді як жодна із застосованих концентрацій свинцю не викликала істотних змін в експресії білка Hsc70 в досліджуваних зразках коропа.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: білки теплового шоку, Hsp70, Hsc70, стрес, свинець, дот-блот-аналіз, лейкоцити, печінка, короп.

ВСТУП. Білки теплового шоку (heatshock-protein, Hsp) являють собою родину висококонсервативних білків, які необхідні клітині у всіх процесах її життєдіяльності, зокрема для адаптації до величезного числа цитотоксичних факторів, як ксенобіотичного, так і природного походження [3, 4]. Найбільш вивченою родиною білків теплового шоку є родина Hsp70, що включає індукований стресовими чинниками Hsp70 і конститутивно експресований клітинами Hsc70. Експресію білків теплового шоку Hsp70 було описано в різноманітних клітинних лініях, тканинах та органах широкого ряду організмів [3]. До найбільш відомих індукторів експресії Hsp належать гіпертермія (нагрівання клітин або організму до сублетальної температури), важкі метали, окиснювальний стрес, органічні розчинники, деякі віруси й отрути [8]. Hsp відносять до природних біомаркерів, і визначення їх кількості в тканинах або клітинах стає однією з цілей діагностики поширених захворювань людини і тварин та/або аналізу впливу чинників, що порушують природне середовище проживання. Актуальність таких досліджень визначається значною мірою зростанням антропогенного впливу на природні водойми, де для риб як кінцевої ланки трофічного ланцюга існує значна токсикологічна загроза [2, 9, 10]. Відомо, що найбільшу небезпеку становить забруднення водойм важкими металами, перш за все свинцем, який навіть у порівняно малій кількості може негативно впливати на організм риб [1, 5, 6]. Отож, метою

роботи було перевірити вплив іонів свинцю на рівень експресії білків теплового шоку родини Hsp70 у печінці та клітинах крові коропа.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідженнях використовували 28 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. Досліджували вплив на риб іонів свинцю при 0,2; 0,5 та 5 мг/дм³, що відповідали 2,5 і 50 гранично допустимим концентраціям (ГДК). Риб витримували 96 год у середовищі з додаванням Pb(CH₃COO)₂. Контрольну групу риб витримували аналогічний термін у звичайних умовах, без додавання ацетату свинцю. Здійснювали постійну аерацію і підтримували температурний режим води на рівні 18–20 °С. Кров забирали за допомогою пастерівської піпетки із серця риб, а також відбирали тканини печінки, які промивали фізіологічним розчином та заморожували в рідкому азоті. Експерименти проводили згідно з правилами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі буфера для лізування, pH 7,4 (10 % N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїназ – “Sigma”, ФРН). Далі зразки центрифугували при 5200 г протягом 5 хв при 4 °С. У лізатах вимірювали

© М. Я. Онисковець, В. В. Снітинський, 2013.

концентрацію білка методом Лоурі. З метою вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка зразки розводили буфером для розведення зразків, рН 7,4 (25 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl). На нітроцелюлозну мембрану (Millipore) наносили лізат об'ємом 3 мкл з однаковим загальним вмістом білка 1–5 мкг. Щоб виявити фонове свічення, на мембрану наносили буфер для лізування та буфер для розведення зразків. Мембрану блокували протягом 1 год у 5 % розчині казеїну. Після нанесення контрольних та дослідних зразків мембрану інкубували з антитілами до білків теплового шоку SAB4501464 ("Sigma", США), [5A5] (ab2787) ("Abcam", США) та [1B5] (ab19136) ("Abcam", США) у ЗФРТ 90 хв та поліклональними козячими антимишачими 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).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При дослідженні вмісту Hsp70 у лейкоцитах коропа лускатого за дії Pb²⁺ встановлено, що 5 та 50 ГДК призводять до значного зростання рівня даного білка порівняно з контролем, де він був відсутній (рис. 1). Так, за умов впливу на риб концентрації 0,2 мг/дм³ Pb²⁺ рівень білка становив (8,15±1,02) у.о., при 0,5 мг/дм³ Pb²⁺ – (40,84±3,58) у.о., а при 5 мг/дм³ Pb²⁺ він сягнув (120,35±10,87) у.о. проти контрольного показника – (1,22±0,12) у.о. Водночас було відзна-

чено відсутність будь-яких вірогідних змін в експресії Hsc70 при застосуванні всіх використаних концентрацій Pb²⁺ у лейкоцитах піддослідних риб (рис. 1).

У печінці досліджуваних риб 0,2 мг/дм³ Pb²⁺ призводило до детектування білка теплового шоку на рівні (19,25±2,12) у.о., а 0,5 та 5 мг/дм³ спричиняли значне зростання вмісту Hsp70 – до (65,27±8,35) та (252,28±18,64) у.о., що, відповідно, у 26 і 100 разів більше від контролю. Таким чином, у контрольній групі було детектовано незначний рівень Hsp70, а всі досліджувані концентрації іонів свинцю дозозалежно збільшували вміст Hsp70, причому найвищий рівень експресії даного білка відмічено за дії 5 мг/дм³ (рис. 2). Якщо ж говорити про Hsc70, то для печінки відзначено аналогічну з лейкоцитами картину, коли жодна з концентрацій іонів свинцю не мала істотного впливу на рівень експресії згаданого білка (рис. 2).

Отже, в результаті наших досліджень було виявлено підвищення вмісту білка Hsp70 за дії всіх концентрацій іонів свинцю на фоні повної відсутності змін в експресії Hsc70. Це можна пояснити тим, що Hsp70 належить до тих білків теплового шоку, які відповідають на широкий спектр стресових чинників, зокрема на дію важких металів [7, 8], тоді як Hsc70, найімовірніше, залучений до більш специфічних механізмів відповіді на детерміновані фактори стресового впливу [4]. Проте головним моментом даної роботи є потенційна можливість використання білків теплового шоку як специфічних маркерів токсичної дії свинцю. З цієї метою можна використовувати Hsp70 і комбінації з Hsc70, коли зростання експресії першого та відсутність змін у рівні другого білка може бути фактором, що підтверджує токсичну дію свинцю на організм тварин.

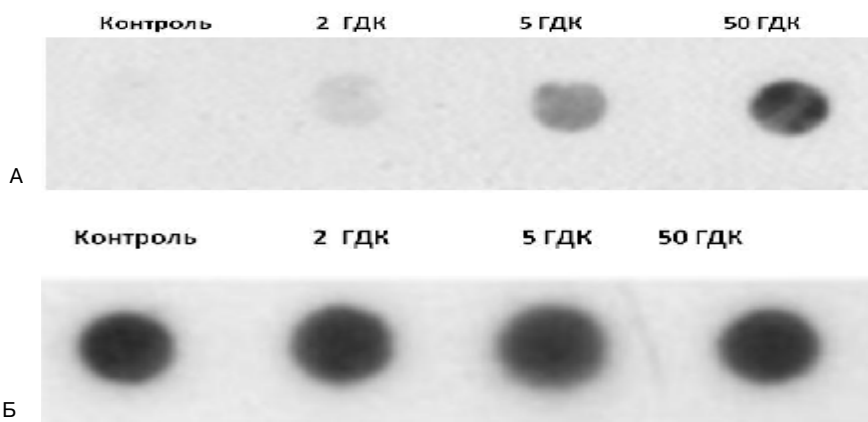


Рис. 1. Дот-блот-аналіз вмісту білків Hsp70 (А) і Hsc70 (Б) у лейкоцитах крові коропа лускатого за дії іонів свинцю.

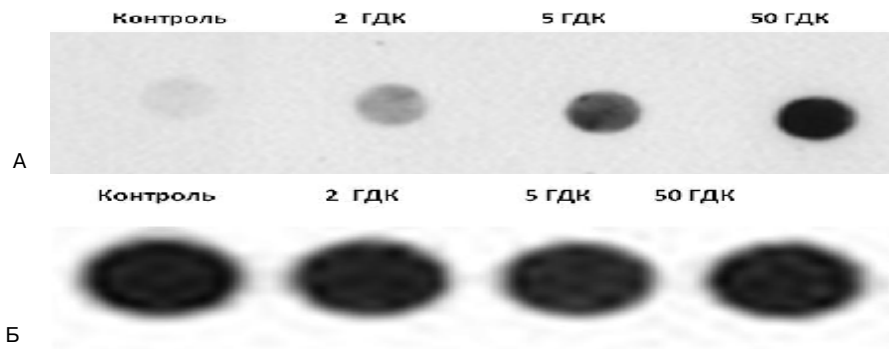


Рис. 2. Дот-блот-аналіз вмісту білків Hsp70 (А) і Hsc70 (Б) у печінці коропа лускатого за дії іонів свинцю.

ВИСНОВКИ. Було встановлено значне зростання білка теплового шоку Hsp70 у лейкоцитах та печінці коропа лускатого за дії всіх концентрацій свинцю. Водночас жодна із застосованих концентрацій іонів свинцю не викликала істотних змін в експресії білка Hsc70. На підставі отриманих даних висувається при-

пущення про наявність кореляції між станом цілого організму і вмістом білків Hsp70 та Hsc70. Передбачається, що Hsp70 перш за все необхідний для захисту від факторів, що викликають клітинний стрес, а білок Hsc70 є незамінним для формування клітинної адаптації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брагинский Л. П. К методике токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах / Л. П. Брагинский, П. Н. Линник // Гидробиол. журн. – 2003. – **39**, № 1. – С. 92–104.
2. Гладышев М. И. Содержание металлов в экосистеме и окрестностях рекреационного и рыбного пруда Бугач / М. И. Гладышев, И. В. Грибовская, Е. А. Иванова // Водные ресурсы. – 2001. – **28**, № 3. – С. 320–328.
3. Евдонин А. Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А. Л. Евдонин, Н. Д. Медведева // Цитология. – 2009. – **51**, № 2. – С. 130–137.
4. Маргулис Б. А. Белки стресса в эукариотической клетке / Б. А. Маргулис, И. В. Гужова // Цитология. – 2000. – **42**, № 4. – С. 323–342.
5. Пилипенко Ю. В. Оценка пищевого качества рыб-биомелиораторов на содержание тяжелых металлов / Ю. В. Пилипенко // Гидробиол. журн. – 2007. – **43**, № 5. – С. 64–77.
6. Токсическое действие соединений свинца на гидробионты и водоплавающих птиц (обзор) / Г. А. Леонова, А. Н. Суторин, И. С. Ломоносов [и др.] // Гидробиол. журн. – 1992. – **28**, № 4. – С. 68–75.
7. Центральные эффекты белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа / Л. И. Андреева, П. Д. Шабанов, Б. А. Маргулис [и др.] // ПФБН. – 2005. – **5**, № 1. – С. 794–803.
8. 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, B. A. Margulis, I. V. Guzhova [et al.] // AquatToxicol. – 2002. – **57**. – P. 267–280.
9. Oliva-Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish / A. Oliva-Teles // Journal of Fish Diseases. – 2012. – **35**, № 2. – P. 83–108.
10. The relative importance of water and food as cadmium source to *Daphnia magna* Straus / C. Barata, S. J. Markich, D. J. Baird [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2002. – **61**. – P. 143–154.

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp70 И Hsc70 В ПЕЧЕНИ И ЛЕЙКОЦИТАХ КАРПА

Резюме

В статье представлены результаты исследований уровня экспрессии белков теплового шока семейства Hsp70 в печени и клетках крови карпа чешуйчатого в условиях отравления солями свинца. Методом иммуноблоттинга было обнаружено значительное возрастание белка Hsp70, тогда как ни одна из применяемых концентраций свинца не вызвала существенных изменений в экспрессии белка Hsc70 в исследуемых образцах карпа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белки теплового шока, Hsp70, Hsc70, стресс, свинец, дот-блот-анализ, лейкоциты, печень, карп.

M. Ya. Onyskovets, V.V. Snitynskyi
LVIV NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY

INFLUENCE OF THE LEAD ON THE EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEINS Hsp70 AND Hsc70 IN LEUCOCYTES AND LIVER OF THE CARP

Summary

Results regarding investigations of the heat shock proteins expression in blood cells and liver of the carp flake under the lead-caused intoxication were presented. By immunoblotting it was found that lead cause increasing of the Hsp70 in target tissues and cells but has no influence on the Hsc70 expression level.

KEY WORDS: heat shock proteins, Hsp70, Hsc70, stress, lead, dot-blotting, leucocytes, liver, carp.

Отримано 18.04.13

Адреса для листування: М. Я. Онисковець, Львівський національний аграрний університет, вул. Володимира Великого, 1, Дубляни, 80381, Україна, e-mail: onyskovets.m@gmail.com.