

ЕКСПРЕСІЯ БІЛКІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ HSP70 І HSP90 У ПАРІЕТАЛЬНИХ КЛІТИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО АТРОФІЧНОГО ГАСТРИТУ

Досліджено рівні експресії білків Hsp70 і Hsp90 в паріетальних клітинах шлунка щурів у нормі та при розвитку експериментального атрофічного гастриту. Виявлено підвищення рівня експресії Hsp70 і Hsp90 на ранній стадії експериментальної моделі.

Hsp70 and Hsp90 expression levels in rat parietal cells were investigated in normal animals and during development of chronic atrophic gastritis model. Increasing in Hsp70 and Hsp90 expression levels in early stages of experimental model development was detected.

Вступ. Білки теплового шоку Hsp70 і Hsp90 належать до молекулярних шаперонів клітини і, відповідно, відіграють ключову роль у фолдингу ряду білків. Так, Hsp70 зв'язується з новосинтезованими поліпептидами під час трансляції на рибосомах. Зв'язування Hsp70 з поліпептидними субстратами відбувається завдяки неспецифічним гідрофобним взаємодіям, таким чином, молекули Hsp70 екранують потенційно гідрофобні кластери в молекулах білків, які синтезуються. В нативних молекулах білків більшість гідрофобних кластерів перебувають в середині глобули, що є одним з додаткових факторів стабілізації третинного і четвертинного рівнів організації білка. За умов стресу нативна конформація білків в клітині може порушуватись. Внаслідок цього гідрофобні кластери молекул можуть з'являтися на поверхні білків. Це є однією з причин утворення нерозчинних білкових агрегатів в клітинах про- і еукаріот за умов теплового, кислотного чи іншого типу стресів. Показано, що утворення нерозчинних білкових агрегатів (тобто, порушення процесів фолдингу і рефолдингу) в клітинах може бути причиною і супроводжує розвиток ряду захворювань людини [1]. Найкраще досліджено накопичення в нейронах так званих тілець включення для ряду нейродегенеративних захворювань. З іншого боку, роль молекулярних шаперонів Hsp70 і, особливо, Hsp90 у розвитку захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ), згідно літературних даних, вивчена недостатньо. Більшість досліджень в цьому напрямку були проведені з використанням культур різних клітин слизової оболонки шлунка. (зокрема, культур клітин слизової оболонки шлунка морських свинок) [1, 2, 3]. Було показано, що у відповідь на дію таких стресових факторів, як підвищена температура (43°C/ 10-30 хв), етиловий спирт (до 0,5 М/ 30 хв), перексид водню (до 0,5 мМ/ 30 хв) та інших, рівень експресії таких білків теплового шоку, як Hsp110, Hsp90, Hsp73, Hsp72 і Hsp60 значно зростає. В умовах *in vivo* для вивчення ролі білків теплового шоку в захворюваннях різноманітних відділів ШКТ, використовуються експериментальні моделі гастриту, виразки шлунка і коліту щурів [2, 3]. При цьому слід зазначити, що при дослідженні експресії білків теплового шоку працюють переважно з загальними лізатами клітин слизової оболонки шлунка чи певних відділів кишківника, тобто, цілісного уявлення про динаміку і рівні експресії даних білків в окремих типах клітин за умов розвитку експериментального гастриту, виразки чи коліту, загалом немає. В наших дослідженнях ми використали модель хронічного атрофічного гастриту (ХАГ) щурів. Метою роботи було дослідити експресію білків Hsp70 і Hsp90 в паріетальних клітинах шлунку на різних етапах розвитку ХАГ.

Матеріали і методи досліджень. Препарат Hsp90, очищеного з мозку бика, люб'язно надано проф.

Я. Кузницьким (Інтернаціональний інститут молекулярної і клітинної біології, Варшава, Польща). Поліклональні антитіла проти DnaK (прокаріотичний аналог еукаріотичного Hsp70) люб'язно надано проф. Н. Пфаннером (Університет м. Фрайбурга, Германия).

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції. У досліді використовували білих лабораторних нелінійних щурів-самців з початковою масою 180-220 г. Групі тварин, протягом 6 тижнів кожного дня вводили 2% саліцилат натрію (2 мл інтрагастрально), а питну воду заміняли на 20 мМ деоксихолат натрію. Піддослідні тварини були розділені на 7 груп: 1 – контрольна, яка утримувалась на стандартному раціоні виварію; 2–7 – тварини з відповідними термінами експериментальної моделі. Щурів, яких відсаджували для голодування протягом 18 год, брали на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й і 6-й тиждень проведення експериментальної моделі [4].

Визначення концентрації білка за методом Бредфорд проводили згідно з методикою описаною раніше з деякими модифікаціями [5]. Реактив для визначення концентрації білка готували наступним чином: 100 мг барвника кумасі G-250 розчиняли в 50 мл 96% етанолу, додавали 100 мл 85% фосфорної кислоти (вага/об'єм) та об'єм отриманого розчину доводили до 1 літра (кінцева концентрація кумасі G-250 складала 0,01%, етанолу – 4,7%, фосфорної кислоти – 8,5%). Калібрувальну криву будували, використовуючи розчин альбуміну сироватки бика (БСА) в якості стандарту. Будували графік залежності поглинання (при довжині хвилі 590 нм) від концентрації білкового розчину. Концентрацію білка в лізатах паріетальних клітин визначали за калібрувальною кривою. Проби для визначення концентрації білка готували наступним чином: відповідний об'єм розчину БСА, або лізату паріетальних клітин додавали до 2 мл реактиву Бредфорд та ретельно перемішували. Через 10 хвилин визначали поглинання суміші при довжині хвилі 590 нм проти проби, яка містила 2 мл реактиву Бредфорд і відповідний об'єм буферу, в якому здійснювали лізис паріетальних клітин. Визначення оптичної густини проб при довжині хвилі 590 нм проводили на спектрофотометрі Spekol 11.

Поліклональні анти-Hsp90 антитіла одержано, як описано в [6].

Електрофорез отриманих лізатів клітин проводили у градієнті концентрації ПААГ (5-12%) в денатуруючих умовах по Laemmli [7]. Розділюючий гель містив 375 мМ тріс HCl (pH 8,8), 0,1% додецил сульфату натрію, 12% суміші акриламід/метилен-біс-акриламід (в пропорції 30 : 0,8). Концентруючий гель містив 127 мМ тріс HCl (pH 6,8), 0,1% додецил сульфату натрію, 5% суміші акриламід/метилен-біс-акриламід. Гелі полімеризували додаванням 1 мкл/мл TEMED і 10 мкл/мл 10% розчину

персульфату амонію. До досліджуваних лізатів додавали 1/4 об'єму буферу для зразків (500 мМ тріс HCl pH 6,8, 5% 2-меркаптоетанолу, 0,1% бромфенолового синього). Зразки прогрівали 5 хвилин при 96°C і наносили на концентруючий гель. Форез проводили в тріс-гліциновому буфері (pH 9,2-9,5) при напрузі 10-20 В/см [7].

Імуноблотинг отриманих проб проводили за описаним методом [8]. Після електрофорезу проб в денатуруючій умові гель відмивали в буфері PBS та проводили пасивний перенос білків на нітроцелюлозну мембрану на протязі 3-4 діб. Вільні сайти адсорбції блокували 5% знежиреним молоком в буфері PBS-T. Після цього мембрану інкубували 1 год з поліклональними антитілами проти Hsp70 (розведення 1 : 1000) і Hsp90 (1 : 30). Після цього мембрану відмивали і інкубували з антитілами, кон'югованими з пероксидазою. Після відмивки мембрану витримували 2 хв в ECL реагенті (1,25 мМ люмінол, 0,45 мМ кумарова кислота, 0,015% H₂O₂ в 100 мМ тріс-HCl буфері (pH 8,5) і 1% сульфоксид) і експонували на рентгенівську плівку.

Результати та їх обговорення. На рис.1 представлені результати імуноблотингу лізатів паріетальних клітин, отриманих на 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й і 6-й тижні розвитку ХАГ у щурів. Експресія білка Hsp70 підвищувалась починаючи з 1-шого тижня розвитку експериментальної хвороби (рис. 1). Рівень експресії білка Hsp90 в порівнянні з контролем незначно зростає на 1-ший і 5-тий і знижувався на 2-гий, 3-тій і 6-тий тижні розвитку ХАГ (рис. 1). Відомо, що в клітинах еукаріот експресуються декілька білків родини Hsp70. Основними з них є конститутивний білок Hsc70 з молекулярною масою 73 кДа і індукційний Hsp70 з молекулярною масою 72 кДа [9, 1]. В наших дослідженнях нами було використано поліклональні антитіла проти білка теплового шоку

DnaK – прокаріотичного аналога еукаріотичного шаперону Hsp70. Коректність досліджень змін експресії Hsp70 в еукаріотичних тканинах за допомогою анти-DnaK антитіл визначена нами в попередніх дослідженнях імунологічної крос-реактивності DnaK та Hsp70 [6]. За даних умов проведення імуноблотингу нам не вдалося диференціювати експресію окремих білків родини Hsp70. Відомо, що шаперони відіграють важливу роль в захисті і підтриманні гомеостазу слизової оболонки ШКТ. Так, Алдерманом, Йін та колегами [10] було показано, що збільшення експресії індукційного білка Hsp70 є одним з механізмів захисту клітин слизової оболонки шлунка від пошкоджень, спричинених введенням розчину солі саліцилової кислоти. Солі саліцилової кислоти можуть індукувати процеси апоптозу в клітинах шлунка. Попередня індукція експресії білка Hsp70 істотно знижувала відсоток клітин слизової оболонки шлунка, які загинули шляхом апоптозу [10]. Хіракавою та колегами було продемонстровано, що збільшення експресії як конститутивного Hsp73, так і індукційного Hsp72, вело до зниження кількості виразок слизової оболонки шлунка, утворених в умовах стресу спричиненого зануренням щурів під воду [2, 10]. З іншого боку, Тсукімі з колегами виявили, що Hsp72 і Hsp47 відіграють важливу роль в захисті клітин шлунка в умовах розвитку виразки, тоді як білок Hsp73 необхідний для забезпечення процесу загоєння виразки слизової оболонки [3]. Відомо, що однією з основних ознак розвитку ХАГ є порушення балансу між процесами проліферації, диференціації, апоптозу та некрозу клітин слизової оболонки [11]. Отже, отримані нами результати можуть вказувати на те, що білки Hsp70 відіграють роль у захисті паріетальних клітин шлунка в умовах розвитку ХАГ.

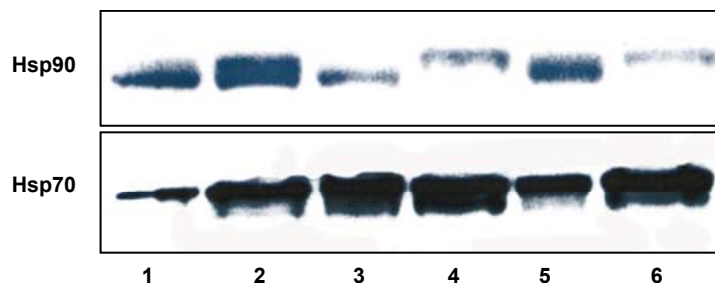


Рис. 1. Експресія білків Hsp70 і Hsp90 в паріетальних клітинах щурів на 1-ший (2), 3-тій (3), 4-тій (4), 5-тій (5) і 6-тій (6) тижні розвитку експериментальної моделі ХАГ, визначена методом імуноблотингу (Western-blot analysis). 1 – контрольний зразок (здорові тварини)

Нами було проведено гістологічні дослідження слизової оболонки шлунка на різних стадіях розвитку ХАГ. На 2-3 тижні спостерігалось потовщення слизової оболонки, а на 5-6, навпаки, достовірне зменшення товщини в порівнянні з контролем. На 4-5 тижні спостерігалось зменшення кількості залоз (атрофія) (дані не представлено). З рис. 1 видно, що збільшення рівня експресії Hsp70 і Hsp90 спостерігалось вже на перший тиждень від початку введення деоксихолату і саліцилату натрію. Таким чином, збільшення експресії даних білків в паріетальних клітинах передують появі морфологічних ознак, характерних для ХАГ. Це може вказувати на те, що дані шаперони відіграють роль в захисті паріетальних клітин шлунка вже на початкових етапах розвитку гастриту у щурів.

Шаперон Hsp90 також відіграє важливу роль у захисті слизової оболонки ШКТ від дії різноманітних пошко-

джуючих факторів. Так, відповідно до літературних даних, підвищення експресії Hsp90 є одним з факторів захисту слизової оболонки шлунка і тонкого кишківника від дії етанолу і перексиду водню [2, 10]. Отриманих нами результатів (рис.1) не достатньо щоб зрозуміти роль Hsp90 у захисті паріетальних клітин в умовах розвитку ХАГ. Проте можливо, що Hsp90, як і Hsp70, відіграє важливу роль у захисті паріетальних клітин на початкових (1-ший тиждень), а також, на кінцевих (5-тий тиждень) етапах розвитку ХАГ (рис. 1).

Висновки. Нами було показано, що на початкових етапах (1-ший тиждень) розвитку ХАГ рівень експресії білків Hsp70 і Hsp90 в паріетальних клітинах збільшується у порівнянні з контролем. На 3, 4, 5 та 6-тий тижні розвитку ХАГ експресія Hsp70 залишається високою, натомість, рівень експресії білка Hsp90 змінюється. Отримані результати дозволяють припустити, що білки

Hsp70 і Hsp90 беруть участь у захисті парієтальних клітин шлунка на перших етапах розвитку хронічного атрофічного гастриту, індукованого введенням деоксихолату і саліцилату натрію.

1. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding // *Phys.Rev.* – 1999. – Vol. 79, № 2. – P. 425–449. 2. Rokutan K. Gastric mucosal protection and cell proliferation. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2000. – Vol. 15. – P. 12–19. 3. Tsukimi Y., Nakai H., Itoh S., Amage K., Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 52, № 3. – P. 391–406. 4. Wang Liang-jing, Chen Shu-jie, Chen Zhe, Cai Jian-ting, Si Jian-min. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and the regulating mechanism of protein expression in rats // *J Zhejiang Univ Science B.* – 2006. – Vol. 8, № 7. – P. 634–640. 5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200. 6. Клуцян Л.Н., Кия-

мова Р.Г., Гришкова В.С., Терентьев А.Г., Филоненко В.В., Сидорчик Л.Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // *Биоп. Клетка.* – 2006. – Т. 2, № 22. – С. 117–120. 7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – 227, № 52. – P. 680–685. 8. Avramis S., Termynck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // *Mol. Immunol.* – 1993. – Vol. 30. – P. 119–127. 9. Oksala N.K.J., Oksala A., Paavonen T., Alhava E., Paimela H. Heat shock preconditioning modulates proliferation and apoptosis after superficial injury in isolated guinea pig gastric mucosa via an eicosanoid and protein synthesis-dependent mechanism // *APMIS.* – 2003. – Vol. 111. – P. 497–506. 10. Tsukimi Y., Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing // *Biol. Pharm. Bull.* – 2001. – Vol. 24, № 1. – P. 1–9. 11. Fox J.G., Wang T.C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer // *J. Clin. Inv.* – 2007. – Vol. 117, № 1. – P. 60–69.

Надійшла до редколегії 12.11.06

УДК 616.24-002.5:612.017.1-07

Л. Сквіка, канд. біол. наук, Є. Шпак, асп.,
Ю. Швець, канд. біол. наук, В. Позур, д-р біол. наук

ДИНАМІКА РОЗВИТКУ ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ КРОЛІВ РІЗНИХ ПОРІД ПРИ КОМБІНОВАНІЙ СХЕМІ ІМУНІЗАЦІЇ МІКОБАКТЕРІЯМИ

Досліджено динаміку гуморальної імунної відповіді у кролів порід Білий та Сірий Велетень при внутрішньовенному у поєднанні з інтраназальним введенням BCG. Сироватки крові кроля породи Білий Велетень продемонстрували більш високу і стабільну реакцію проти поверхневих антигенів мікобактерій у титрах 1:64, 1:32, 1:16 та 1:8.

Dynamics of humoral immune response in rabbits of White and Grey Giant Strains was investigated related to intravenous+intranasal schedule of immunization. Positive serum reactivity of rabbits of White Giant Strain in titers 1:64, 1:32, 1:16, 1:8 was demonstrated.

Вступ. Дані світової літератури свідчать про те, що смертність від інфекції викликані мікобактеріями туберкульозу в популяції людей продовжує зростати [4, 6, 9]. Це відбувається не лише за рахунок активної передачі збудника, особливо до імунокомпрометованих осіб, але і через виникнення великої кількості мультирезистентних до антибіотиків штамів *Mycobacterium tuberculosis* [8, 10]. Загальноприйнятим в клінічній практиці методом профілактики туберкульозу є імунізація живими послабленими клітинами вакцинного штаму *Mycobacterium bovis BCG* [1]. В літературі є відомості про те, що асоційовані з CD1b антигени такі як, ліпідоманан та міколові кислоти, мають подібні структури у мікобактерій штаму BCG і *M. tuberculosis* [4]. Тому введення BCG призводить до утворення рестриктованих за асоційованими з CD1b антигенами Т-клітин, які специфічно реагують і на подібні антигени *M. tuberculosis*. Рядом дослідників [1] показано, що вакцинація новонароджених BCG сприяє розвитку у них протективних клітинних імунних механізмів, спрямованих проти збудника туберкульозу. Однак, захворювання може виникнути і у імунізованих осіб. Аналіз літературних даних [1] свідчить про те, що вакцинація населення зменшує ризик розвитку захворювання лише приблизно на 50%. В зв'язку з цим питання про розробку методів профілактики туберкульозу залишається однією з актуальних проблем охорони здоров'я у всьому світі.

Важливу роль у протиінфекційному захисті макроорганізму відіграє гуморальна ланка імунітету. Особливо значущим є її внесок у нейтралізацію розчинних бактеріальних субстанцій (токсинів, компонентів зруйнованих бактеріальних клітин) [2, 7]. Крім того, реакції антитілозалежної клітинної цитотоксичності забезпечують елімінацію мікроорганізмів, в тому числі бактерій-внутрішньоклітинних паразитів таких, як бактерії роду *Mycobacterium* [6]. Поглиблене вивчення особливостей формування гуморальної імунної відповіді до антигенів мікобактерій і розробка оновлених підходів імунізації

чутливих осіб може скласти підґрунтя для створення нових ефективних засобів профілактики туберкульозу.

Метою даної роботи була порівняльна характеристика динаміки розвитку гуморальної імунної відповіді кролів різних порід до поверхневих антигенів BCG при комбінованому введенні імуногену.

Об'єкт та методи досліджень. Об'єктом дослідження були аутбредні кролі порід Сірий та Білий Велетні (самці). Вік тварин складав 3–4 місяці, середня вага – 3 кг.

Для імунізації дослідних кролів використовували вакцинний штам *Mycobacterium bovis (BCG)* (Сумська біофабрика, Україна).

Перед культивуванням бактерії витримували в стимуляторі росту (Київ ЗАТ "Ганза") для прискореного виявлення мікобактерій протягом 24 годин при температурі 37°C. Бактерії культивували на середовищі БКГ (Київ ЗАТ "Ганза") при 37°C протягом 48 годин.

Для імунізації тварин використовували мікобактерії паличкоподібної форми [1]. Для цього готували суспензію клітин шляхом змиву їх фізіологічним розчином з поверхні чашки Петрі. Титр бактеріальної суспензії для імунізації становив 10^{10} КУО/мл.

В роботі було використано комбіновану схему імунізації, яка поєднувала внутрішньовенне та інтраназальне введення імуногену: бактеріальну суспензію приготували описаним вище способом, вводили по 0,5 мл внутрішньовенно та інтраназально. Після цього проводили три реімунізації з інтервалом 2–3 доби. Через 35 днів після останньої реімунізації проводили серію бустерних ін'єкцій: внутрішньовенно вводили імуноген тричі з інтервалом в 1 добу. Після останньої реімунізації проводили перший забір крові для попереднього тестування специфічності антисироватки. В наступні 35 днів тварин не імунізували – кров для тестування протягом цього періоду брали двічі: через 7 та 14 днів. Останній забір крові проводили через 7 днів після серії бустерних ін'єкцій.

Схема бустерних ін'єкцій продиктована тим, що такий протокол підсилюючих імунізацій вважається найбільш ефективним для стимуляції антитілопродукції [5].

© Сквіка Л., Шпак Є., Швець Ю., Позур В., 2007