

УДК 615.9:595.384.12

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ И РЕАКЦИИ ГЕНА *hsp70* НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АРИСТОЛОХОВОЙ КИСЛОТЫ У *Neocaridina davidi* (КРАСНАЯ КРЕВЕТКА)

© 2023 г. П. Р¹, *, Т. Джитин¹

¹Кафедра биотехнологии, Колледж Мар Афанасия, Котамангалам, Керала, Индия

*e-mail: parvathyrbinu@gmail.com

Поступила в редакцию 24.02.2023 г.

После доработки 15.03.2023 г.

Принята к публикации 17.03.2023 г.

Исследованы морфологические аномалии и сверхэкспрессия одного из генов стресса (*hsp70*) при различных концентрациях экстракта аристолохии *Aristolochia*. Растительный материал для исследования механически измельчен для приготовления настоя. Креветки *Neocaridina davidi* акклиматизированы в лаборатории. Воздействие аристолоховой кислоты на креветок в концентрациях 6000, 12000, 18000, 24000 и 30000 ppm через 48 ч приводит к морфологическим аномалиям развития начиная с концентрации 18000 ppm. Анализ экспрессии показал, что транскрипция *hsp70* у подвергнутых воздействию *N. davidi* при 24000 ppm (72 ч) выше, чем в контроле. Данные, полученные в ходе текущего исследования, помогают лучше понять токсичность аристолоховой кислоты, что указывает на необходимость регулирования производства и потребления растительных продуктов, содержащих аристолоховую кислоту в высокой концентрации.

Ключевые слова: *Aristolochia*, аристолоховая кислота, *Neocaridina davidi*, морфологические аномалии, белки теплового шока (HSP)

DOI: 10.31857/S0042132423040087, **EDN:** DACSJN

ВВЕДЕНИЕ

Aristolochia indica принадлежит семейству Aristolochiaceae (Kanjilal et al., 2009; Jirovetz et al., 2019). Известны другие названия: родильница, трубочник, голландская трубка. Вид широко распространен в засушливых и ползасушливых регионах Индийского субконтинента (Bhattacharjee P., Bhattacharjee D., 2013). Морфологические характеристики *A. indica*: многолетнее ползучее растение с древесным подвоем (Soniya, Sujitha, 2006; Siregar et al., 2021). Различные элементы и части растения используются в народной медицине: свежий сок листьев — в качестве противоядия при укусах змей, корни — при лечении кожных заболеваний, кора и листья — для облегчения симптомов диареи и лихорадки, стебли — при лечении сибирской язвы (Abhishiktha et al., 2015). Эти же компоненты применяются и при производстве лекарственных препаратов: abortивных, седативных, анальгетических, противовоспалительных средств, миорелаксантов, антигистаминных препаратов (Lerma-Herrera et al., 2022).

Важный компонент, содержащийся в растениях рода *Aristolochia*, — аристолоховые кислоты (АК) (Gökmen et al., 2013). АК — нитрофенантрен-карбоновые кислоты, которые представлены дву-

мя группами: аристолоховой кислотой I (АК-I) и аристолоховой кислотой II (АК-II) (Shibutani et al., 2007; Chen et al., 2012). АК — не только нефро- и гепатотоксины, провоцирующие хронические заболевания почек и печени, но и мощные канцерогены, ассоциированные с уротелиальной карциномой верхних мочевых путей. Употребление продуктов, содержащих АК, в частности отваров трав, вызывает нефропатию аристолоховой кислоты (Han et al., 2019; Liang et al., 2022). Также на бактериях, на клетках млекопитающих, в частности мышей, установлена (Mei et al., 2006) мутагенность и АК-I, и АК-II.

Neocaridina davidi, также называемая красной креветкой, — пресноводный организм, обычно встречающийся на азиатском субконтиненте (Siregar et al., 2021). У аквариумистов *N. davidi* пользуется признанием благодаря своему огненно-красному цвету. Но они также обладают характеристиками, обеспечивающими их широкое использование в научных исследованиях: быстрый рост, высокая скорость размножения и выживаемость. В частности, *N. davidi* являются отличной моделью для токсикологических исследований, поскольку они демонстрируют последствия воздействия различных препаратов в виде изме-

нений в их жизненном цикле, в росте и в размножении (Hu et al., 2019; Parolini, 2020). Гепатопанкреас креветок, совмещающий привычные функции печени и поджелудочной железы, играет важную роль в переваривании, абсорбции, выделении и детоксикации, что делает его органом, способствующим выживанию при различных стрессах, имеющих источником окружающую среду. Белки теплового шока, также называемые белками стресса, — HSP (heat shock proteins) — вырабатываются не только при повышении температуры, но и при наличии различных стрессирующих агентов: пестицидов, тяжелых металлов или токсичных соединений. HSP70 — представители семейства белков теплового шока (с молекулярной массой 70 кДа), именно они первыми экспрессируются в условиях стресса; HSP70 — высококонсервативные белки, обладающие способностью восстанавливаться при повреждении (Gupta et al., 2010).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и экстракция растительного материала.

Растение *A. indica* собрано в питомнике Нагарджуна в Тодупуе 11.08.2022 г. Растительный материал подвергали поверхностной стерилизации с использованием моющего средства и промывали в водопроводной воде в течение 10 мин с последующей окончательной промывкой в дистиллированной воде перед проведением процедуры. Готовили 2%-ный (масса/объем) настой на листьях *A. indica*. Брали 15 г листьев, разделяли их на части, погружали в предварительно нагретую до 95°C дистиллированную воду и полученной смеси давали настояться 15 мин при комнатной температуре, прежде чем фильтровать через аналитическую фильтровальную бумагу.

Тест на токсичность у Neocaridina davidi.

N. davidi выдерживали при искусственном освещении с достаточной аэрацией в течение 48 ч. Приготовили растительные экстракты пяти концентраций — 6000, 12000, 18000, 24000, 30000 частей на миллион, или ppm. Эти пять концентраций были применены к каждому из пяти наборов экспериментальных моделей.

Морфологические аномалии развития N. davidi.

У каждой из креветок были обнаружены изменения и в глазах, и в хвостах. Одновременно выпуклые глаза и закрытые эндопод и экзопод (структуры хвоста) замечены при токсических состояниях.

Извлечение РНК и синтез кДНК. Ткань гепатопанкреаса брали у креветок и измельчали с помощью ступки и пестика, сразу помещая ее в 1000 мкл реагента Trizol (Invitrogen, USA) на 2 мин. В гомогенат добавляли 300 мкл хлороформа в соотношении 24 : 1 и хорошо перемешивали, встряхивая. Затем его центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4°C. Водный слой экстрагировали

в свежую центрифужную пробирку и добавляли 600 мкл изопропанола и перемешивали, переворачивая 2–3 раза с последующим центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали и добавляли 75% холодного этанола для дальнейшей промывки. Снова центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C. Сливали надосадочную жидкость и высушивали РНК на воздухе в течение 10 мин. Наконец, ресуспендировали РНК в 20 мкл дистиллированной воды, не содержащей нуклеотидов. Общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК первой цепи с использованием набора для синтеза кДНК 6110A PrimeScript™ (Takara BIO, Japan) в соответствии с протоколом производителя.

Количественная ПЦР в реальном времени. Чтобы определить характер экспрессии гена *hsp70* в тканях *N. davidi*, подвергшихся воздействию различных концентраций аристолоховой кислоты, проведена относительная количественная ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) на кДНК, полученной из общей РНК. В реакционном объеме 25 мкл использовали 12.5 мкл ПЦР-мастер-смеси SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, USA), по 1.2 мкл прямого и обратного праймеров и 5 мкл матрицы кДНК. Количественную ПЦР проводили в циклических условиях: денатурация при 95°C в течение 10 мин, затем 45 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с, отжиг праймеров при соответствующей температуре отжига в течение 30 с и удлинение при 72°C в течение 30 с.

Статистический анализ. Разницу между средними значениями одного гена анализировали с использованием одностороннего ANOVA, при $p < 0.05$ различия значимы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Смертельные случаи у N. davidi. При концентрациях 6000, 12000 и 18000 ppm не было выявлено смертности, и коэффициент выживаемости составил 100%. Две другие концентрации 24000 и 30000 ppm показали 20%-ный коэффициент смертности (табл. 1).

Морфологические аномалии у N. davidi. Проанализированные с помощью составного микроскопа *Neocaridina davidi* продемонстрировали изменения в глазах и в хвостах. При нормальных условиях структуры эндопода и экзопода находятся в открытом широко развернутом состоянии. В токсичных условиях в теле креветок произошли серьезные изменения, установлено закрытое состояние эндопода и экзопода (рис. 1). Даже после 72 ч воздействия у *Neocaridina davidi* хвост — и эндопод, и экзопод — продолжает быть закрытым, при этом отмечено, что глаза становятся выпуклыми, в то время как у особей, пребывающих в обычных

Таблица 1. Процент смертности и морфологических аномалий от общего числа креветок *Neocaridina davidi*

Концентрации растительного экстракта	Уровень смертности	Морфологические аномалии	
		глаза	хвост
6000 ppm	—	—	—
12000 ppm	—	—	—
18000 ppm	—	20	40
24000 ppm	20	60	80
30000 ppm	20	80	80

условиях, хвост открыт (эндопод и экзопод), и глаза в норме.

Относительная количественная экспрессия. Общую РНК выделяли из гепатопанкреаса *N. davidi*, экспонированного 72 ч, и синтезировали кДНК для проведения количественной ПЦР в реальном времени, которая позволяет определить экспрессию гена *hsp70* путем сравнения его с экспрессией гена β-актина. Анализ экспрессии показывает, что самая высокая транскрипция *hsp70* наблюдается у *Neocaridina davidi*, подвергшихся воздействию токсина в концентрации 24000 ppm

на протяжении 72 ч. Остальные концентрации показали очень небольшую экспрессию генов, по сравнению с 24000 ppm (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании *N. davidi* рассматривается как идеальный модельный организм для токсикологических исследований (Hu et al., 2019). Этот вид обладает потенциалом быстрого распространения в пресноводной экосистеме. Длина тела взрослой особи может достигать максимально-го размера 2.85 см, что помогает в отслеживании в

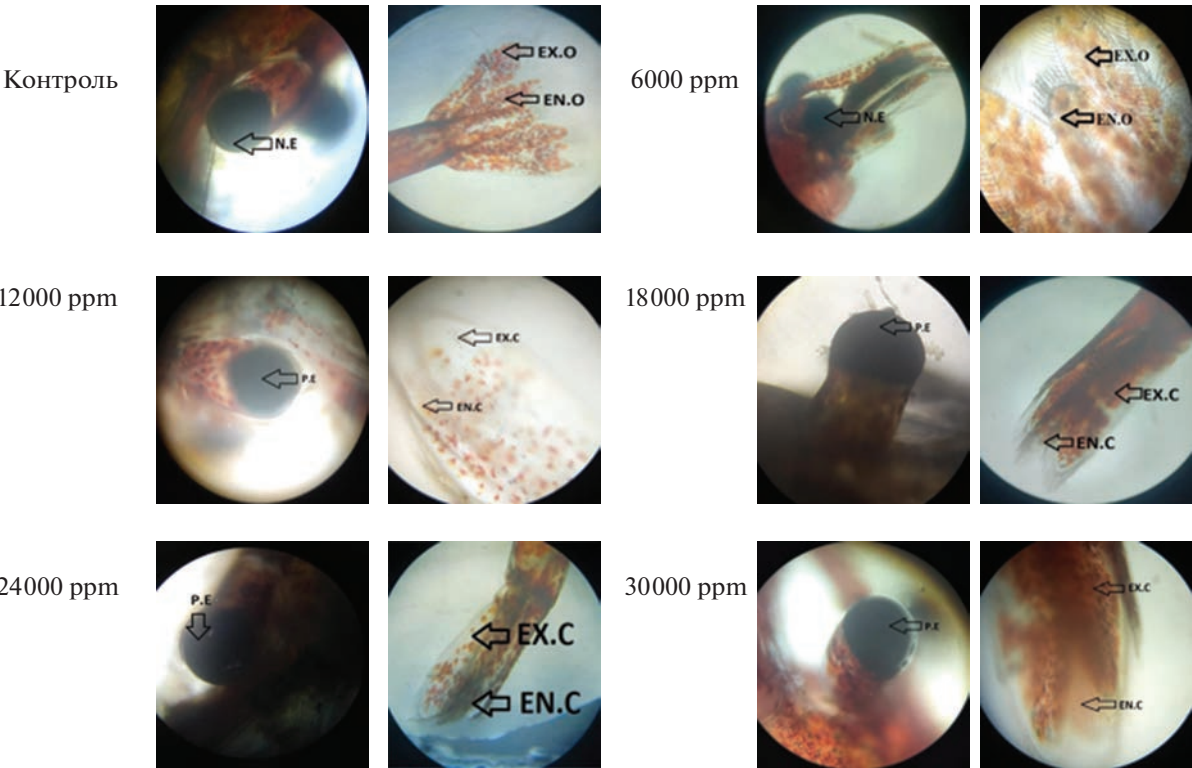


Рис. 1. Морфологические аномалии, наблюдаемые в глазах и в хвостах *Neocaridina davidi*, у которых при 6000 ppm были обнаружены нормальные глаза, а также открытые эндопод и экзопод. При 12000, 18000, 24000 и 30000 ppm отображены выступающий глаз, а также закрытые эндопод и экзопод.

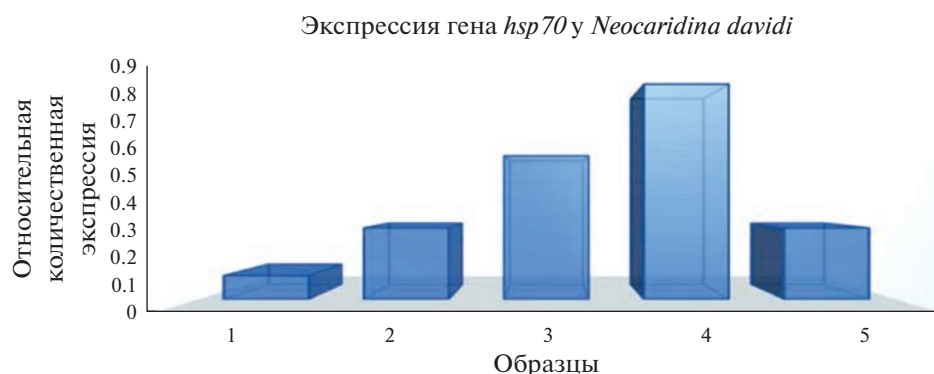


Рис. 2. Относительная количественная экспрессия гена *hsp70* у *Neocaridina davidi* при обработке различными концентрациями аристолоховой кислоты. Образцы: 1 – 6000, 2 – 12000, 3 – 18000, 4 – 24000, 5 – 30000 ppm.

экспериментальных целях. Кроме того, исследования токсичности на тканевом уровне могут быть проведены либо на молекулярном, либо на биохимическом уровне (Siregar et al., 2021).

В этом исследовании *N. davidi* представляет собой идеальную нецелевую модель для изучения токсичности АК в отношении беспозвоночных. Исследования токсичности АК проводились на различных животных, в частности на рыбках Данио, но исследовательские работы, которые фокусировались бы на организмах, не являющихся мишенями, немногочисленны (Yang et al., 2012; Tian et al., 2021; Xu et al., 2021). В ряде исследований указывается на нефротоксическое действие АК на рыбок Данио, а также упоминается, что чрезмерное воздействие АК приводит к повреждениям почек и у других животных (Wang et al., 2020; Xu et al., 2021).

В нашем исследовании воздействие различных концентраций АК на красных креветок не привело к каким-либо поведенческим изменениям или уменьшению подвижности. Но в других токсикологических исследованиях отмечены всевозможные изменения двигательной активности (Al-Badran et al., 2019; Siregar et al., 2021). Коэффициент смертности креветок, подвергшихся воздействию наиболее высоких концентраций АК в нашем исследовании аналогичен коэффициенту, полученному в других недавно проведенных работах (Siregar et al., 2021).

В условиях экстремальной токсичности АК во внешнем виде креветок произошли серьезные изменения: отмечено закрытое состояние эндопода и экзопода. Аналогичные результаты наблюдались в предыдущих токсикологических исследованиях креветок в растворе токсина (Venkateswara Rao et al., 2007): эндопод и экзопод в закрытом состоянии через 48–72 ч после начала воздействия. Также наблюдалась выпученность глаз. При этом отмечено, что закрытое состояние не мешает передвижению креветок даже через 72 ч.

Гены белка теплового шока в основном принимают участие в ответе на стресс, спровоцированный окружающей средой, и влияют на акклиматизацию, а также физиологию, иммунологию, эндокринологию, развитие и старение морских организмов. В настоящем исследовании ставилась цель проанализировать количественную экспрессию гена *hsp70* при экстремальном воздействии АК. Повышенная регуляция была отмечена при воздействии 24000 ppm АК (при 72-часовой обработке), но уже при воздействии 30000 ppm АК регуляция понижена. Такого рода колебания в паттерне экспрессии констатированы в предыдущих работах (Rungrassamee et al., 2010; Das et al., 2015). Главным образом это связано с тем, что экспрессия гена *hsp70* колеблется под влиянием различных условий окружающей среды (Mahmood et al., 2014).

В настоящей работе установлено, что экстремальное воздействие АК вызывает морфологические деформации и влияет на стадии развития организмов, не являющихся мишенями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время аристолоховая кислота идентифицируется как группа токсинов, которые не только могут вызывать терминальную стадию почечной недостаточности, но также несут в себе высокую вероятность онкологических изменений в организме человека.

Мы успешно продемонстрировали неблагоприятное воздействие аристолоховой кислоты на нецелевой организм. *Neocaridina davidi*, подвергавшаяся воздействию различных концентраций аристолоховой кислоты, демонстрировала морфологические аномалии развития. Повышение концентрации приводит к летальному исходу.

Наши результаты также показали сверхэкспрессию гена *hsp70* в образцах, обработанных высокими концентрациями аристолоховой кислоты.

Предыдущие исследования демонстрировали токсичность аристолоховой кислоты для целевых организмов. Наше исследование доказало вред данного токсина на примере нецелевых организмов — красных креветок.

Таким образом, наши результаты еще раз подтверждают необходимость особого внимания со стороны ВОЗ к отказу от использования аристолохии в медицинских целях.

При этом наши результаты открывают новые возможности для проведения трансляционных исследований, полезных для промысла креветок в частности, и для аквакультуры в целом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода за животными и их использования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abhishiktha S.N., Saba S., Shrunga M.N. et al. Antimicrobial and radical scavenging efficacy of leaf and flower of *Aristolochia indica* Linn. // Sci. Technol. Arts Res. J. 2015. V. 4. P. 103–108.
<https://doi.org/10.4314/star.v4i1.17>
- Al-Badran A.A., Fujiwara M., Mora M.A. Effects of insecticides, fipronil and imidacloprid, on the growth, survival, and behavior of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* // PLoS One. 2019. V. 14. P. e0223641.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223641>
- Bhattacharjee P., Bhattacharyya D. Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites // J. Ethnopharmacol. 2013. V. 145. P. 220–226.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.056>
- Chen C.-H., Dickman K.G., Moriya M. et al. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan // PNAS USA. 2012. V. 109. P. 8241–8246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1119920109>
- Das S., Mohapatra A., Sahoo P.K. Expression analysis of heat shock protein genes during *Aeromonas hydrophila* infection in rohu, *Labeo rohita*, with special reference to molecular characterization of Grp78 // Cell Stress Chaperones. 2015. V. 20. P. 73–84.
<https://doi.org/10.1007/s12192-014-0527-2>
- Gökmen M.R., Cosyns J.-P., Arlt V.M. et al. The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: a narrative review // Ann. Inter. Med. 2013. V. 158. P. 469–477.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-6-201303190-00006>
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M. et al. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? // Life Sci. 2010. V. 86. P. 377–384.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015>
- Han J., Xian Z., Zhang Y. et al. Systematic overview of aristolochic acids: nephrotoxicity, carcinogenicity, and underlying mechanisms // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 648.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00648>
- Hu X.L., Niu J.J., Meng Q. et al. Effects of two juvenile hormone analogue insecticides, fenoxycarb and methoprene, on *Neocaridina davidi* // Environ. Pollut. 2019. V. 253. P. 89–99.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.120>
- Jirovetz L., Buchbauer G., Puschmann C., Fleischhacker W. Analysis of the essential oil of the aerial parts of the medicinal plant *Aristolochia indica* Linn. (Aristolochiaceae) from South-India // Sci. Pharm. 2000. V. 68. P. 309–316.
<https://doi.org/10.3797/scipharm.aut-00-28>
- Kanjilal P.B., Kotoky R., Couladis M. Chemical composition of the stem oil of *Aristolochia indica* L. // J. Essen. Oil Res. 2009. V. 21. P. 24–25.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700098>
- Lerma-Herrera M.A., Beiza-Granados L., Ochoa-Zarzosa A. et al. Biological activities of organic extracts of the genus *Aristolochia*: a review from 2005 to 2021 // Molecules. 2022. V. 27. P. 3937.
<https://doi.org/10.3390/molecules27123937>
- Liang Z., Chen T., Yang F. et al. Toxicity of chronic waterborne zinc exposure in the hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* // Chemosphere. 2022. V. 309. P. 136553.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136553>
- Mahmood K., Jadoon S., Mahmood Q. et al. Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins // BioMed Res. Int. 2014. V. 2014. P. 564136.
<https://doi.org/10.1155/2014/564136>
- Mei N., Arlt V.M., Phillips D.H. et al. DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver // Mutat. Res. 2006. V. 602. P. 83–91.
- Parolini M. Toxicity of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: a review // Sci. Total Environ. 2020. V. 740. P. 140043.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043>
- Rungrassamee W., Leelatanawit R., Jiravanichpaisal P. et al. Expression and distribution of three heat shock protein genes under heat shock stress and under exposure to *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* // Dev. Comp. Immunol. 2010. V. 34. P. 1082–1089.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.012>
- Shibutani S., Dong H., Suzuki N. et al. Selective toxicity of aristolochic acids I and II // Drug Metab. Dispos. 2007. V. 35. P. 1217–1222.
<https://doi.org/10.1124/dmd.107.014688>
- Siregar P., Suryanto M.E., Chen K.H.-C. et al. Exploiting the freshwater shrimp *Neocaridina denticulata* as aquatic invertebrate model to evaluate nontargeted pesticide induced toxicity by investigating physiologic and biochemical parameters // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 391.
<https://doi.org/10.3390/antiox10030391>
- Soniya E.V., Sujitha M. An efficient *in vitro* propagation of *Aristolochia indica* // Biol. Plant. 2006. V. 50. P. 272–274.

- Tian Y., Niu J., Zhu Q. *et al.* Breeding of Tianfu broilers, Heilongjiang // Anim. Husb. Vet. Med. 2021. V. 6. P. 36–41.
- Venkateswara Rao J., Kavitha P., Jakka N.M. *et al.* Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2007. V. 53. P. 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0226-9>
- Wang X., Giusti A., Ny A., Witte P.A. Nephrotoxic effects in zebrafish after prolonged exposure to aristolochic acid // Toxins. 2020. V. 12. P. 217. <https://doi.org/10.3390/toxins12040217>
- Xu D., Ran C., Yin L. *et al.* Acute and subchronic toxicity studies of aristolochic acid A in Tianfu broilers // Animals (Basel). 2021. V. 11 (6). P. 1556. <https://doi.org/10.3390/ani11061556>
- Yang L., Su T., Li X.-M. *et al.* Aristolochic acid nephropathy: variation in presentation and prognosis // Nephrol. Dial. Transplant. 2012. V. 27. P. 292–298.

Evaluation of Morphological Malformities and *hsp70* Gene Response on Aristolochic Acid Exposed *Neocaridina davidi* (Red Shrimp)

Parvathy R^a, * and Thomas Jithin^a

^aThe Department of Biotechnology; Mar Athanasius College, Kothamangalam, Kerala, India

*e-mail: parvathyrbinu@gmail.com

In our study, we investigated morphological abnormalities and overexpression of one of the stress genes (*hsp70*) at different concentrations of Aristolochia extract. The plant material and animal for study was collected. The plant was mechanically grinded to prepare the infusion. The shrimp were acclimatized in a laboratory. Aristolochic acid (AA) exposure at concentrations 6000, 12000, 18000, 24000 and 30000 ppm to shrimp after 48 h, led to morphological malformations at 18000 ppm concentration. Expression analysis revealed that the transcription of *hsp70* was higher in 24000 ppm (72 h) exposed *N. davidi* relating to control. The data obtained from the current study helps in better understanding of aristolochic acid induced toxicity, thus indicating the regulation of herbal products containing aristolochic acid in high concentration.

Keywords: *Aristolochia*, aristolochic acid, *Neocaridina davidi*, morphological malformities, heat shock proteins (HSP)