

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ  
ГИДРОБИОЛОГИЯ

---

УДК 57.021

**ВЛИЯНИЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ РТУТИ  
НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ RPA1 И P53 ГОЛОВНОГО МОЗГА РАДУЖНОЙ  
ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

**Сухаренко Е.В.<sup>1</sup>, Недзвецкий В.С.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Керченский государственный морской технологический университет»,  
г. Керчь, Российская Федерация

<sup>2</sup>Бингельский университет, г. Бингель, Турция

<sup>3</sup>Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара, г. Днепр, Украина  
e-mail: [helenasuhar@gmail.com](mailto:helenasuhar@gmail.com), [nedzvetskyvictor@gmail.com](mailto:nedzvetskyvictor@gmail.com)

Исследование проводили с использованием в качестве тест-объекта радужной форели, подвергнутой воздействию неорганической ртути в концентрациях 25% ЛК<sub>50</sub> и 50% ЛК<sub>50</sub> в течение 2 и 7 дней. Полученные результаты показали, что снижение уровня белка р53 сопровождается повышением уровня протеина RPA1 в головном мозге рыб, обитающих в среде с сублетальными концентрациями препарата. Повышенная экспрессия RPA1 может быть одним из критических факторов клеточной адаптации при стрессе в головном мозге радужной форели, вызванном неорганической ртутью. Полученные результаты позволяют предположить, что Hg-индуцированная генерация АФК связана с модуляцией экспрессии как р53, так и RPA1 при клеточном ответе на цитотоксическое действие ртути. Снижение содержания протеина р53 и повышение уровня белка RPA1 в тканях головного мозга рыб под воздействием неорганической ртути установлено впервые. Выявленная регуляция белка RPA1 может служить частью клеточного ответа на разрывы ДНК, вызванные ионами неорганической ртути.

Ключевые слова: неорганическая ртуть; RPA1; р53; нейротоксичность; загрязнение окружающей среды; радужная форель.

### Введение

Антропогенное загрязнение природных вод тяжелыми металлами является общемировой проблемой (Meena, 2017). Эта группа токсикантов представляет серьезную потенциальную опасность для живых организмов, особенно в водных экосистемах (Hass-Schun, 2015). К наиболее опасным и довольно распространенным тяжелым металлам относится ртуть. Основными источниками антропогенного загрязнения водоемов ртутью являются предприятия горнорудной, металлургической промышленности, энергетики и транспорта (Horowitz, 2014; Obrist, 2018). Превышающие допустимый уровень концентрации ртути зафиксированы как в донных отложениях, так и в поверхностных водах многих водоемов мира (Eagles-Smith, 2016). Известно, что этот металл обладает способностью накапливаться в организме гидробионтов, индуцируя разнообразные клеточные повреждения (Orihel, 2007; Eagles-Smith, 2016; Chang, 2017; Carocci, 2019). Накопление ртути происходит в жизненно важных органах (жабрах, почках, печени, мышцах, головном мозге) у многих видов рыб, в том числе у *Cyprinus carpio*, *Salmo salar*, *Pomatoschistus microps*, *Liza aurata* (Simon, 2001; Amlund, 2007; Vieira, 2009; Brandão, 2015; Gymez-Olivon, 2017). Степень токсичности соединений ртути во многом зависит не только от концентрации, но и от формы, которая наиболее стабильна в водной среде. Показано, что органическая ртуть обладает более высокой нейротоксичностью, чем ртуть в составе неорганических веществ. Это обусловлено

способностью органических молекул, содержащих ртуть, преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливаться в тканях мозга (Wang, 2003; Pereira, 2014; Cariccio, 2019). Несмотря на то, что неорганическая ртуть, как правило, обладает невысокой проникающей способностью, имеются данные о нарушении целостности ГЭБ в присутствии солей ртути вследствие их взаимодействия с мембранными структурами клеток, создающими ГЭБ (Zheng, 2003). Многие авторы отмечают присутствие неорганической ртути в головном мозге рыб (Mieiro, 2011; Pereira, 2014; Lohren, 2016). Неорганические соединения ртути могут быть выявлены в клетках головного мозга уже через несколько дней после интоксикации (Pereira, 2015). Имеются данные, что неорганическая ртуть в недифференцированных клеточных культурах более токсична для нейронов и глиальных клеток, чем метилированная ртуть (Monnet-Tschudi, 1996), а ее присутствие в глиоцитах мозга может инициировать дегенерацию нейронов (Ohgoh, 2000). Однако молекулярные механизмы выживания клеток мозга при воздействии ртути, а также диапазон клеточного ответа на ее цитотоксическое действие остаются практически нераскрытыми.

Наиболее изученной реакцией на присутствие ртути в клетке является повышение содержания активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, развитие окислительного стресса (Simmons, 2011). Некоторые авторы предлагают использовать реакцию антиоксидантных систем на воздействие ртути в тканях рыб в качестве валидного биомаркера токсичности (Van der Oost, 2003; Santovito, 2012). Однако активность антиоксидантных ферментов, модулируемая различными повреждающими факторами, имеет общие черты, которые не зависят от природы загрязняющего вещества (Valavanidis, 2006; Pillet, 2019). Несмотря на то, что различные токсиканты могут вызывать однотипный ответ антиоксидантной системы, регистрация показателей окислительного стресса, а также активности антиоксидантной системы является важным дополнением в изучении действия тяжелых металлов (Antunes Dos Santos, 2018). Другая особенность воздействия ртути обусловлена ее высоким сродством к гемоглобину, что может привести к гипоксическому повреждению мозга (Giblin, 1975). Некоторые авторы связывают прооксидантное действие ртути с генотоксичностью. В частности, показаны генотоксические эффекты ртути на клетки крови обыкновенного карпа (Gomez-Olivon, 2017).

Известно, что пролиферативная активность клеток регулируется различными факторами и во многом зависит от экспрессии белков, участвующих в репликации ДНК. К таким белкам относят репликативный белок А (RPA), связывающий одноцепочечную ДНК эукариотических клеток. В ходе инициации транскрипции RPA уравнивает одноцепочечную область ДНК, поэтому его присутствие необходимо как в начальной, так и в последующей фазе репликации. Белок RPA является гетеромерным и состоит из трех субъединиц (RPA1, RPA2 и RPA3). ДНК-связывающая активность опосредована доменами RPA1-субъединицы (70-kDa), которая участвует в процессах репликации, репарации, рекомбинации ДНК и помещает белки во вновь образованную вилку репликации (Zou, 2003). Нарушения RPA-ассоциированной клеточной активности инициируют геномный дисбаланс, поэтому содержание RPA1 служит маркером не только клеточного цикла, но и ответной реакции на повреждение ДНК, вызванной действием токсикантов (Choi, 2010).

Еще одним универсальным и многофункциональным регуляторным белком, играющим жизненно важную роль в большинстве типов клеток, является p53, который обеспечивает жизнеспособность клеток через множество сигнальных путей. В нормальном физиологическом состоянии уровень содержания протеина p53 регулируется эндогенными факторами. Его экспрессия чувствительна к увеличению содержания АФК и окислительным повреждениям макромолекул. Показано, что белок p53 участвует в качестве одного из ключевых регуляторов программируемой гибели клеток в процессе противоопухолевой защиты и может «переключить» метаболизм на

критические изменения в клеточном цикле и/или генотоксические повреждения. Кроме того, белок p53 является транскрипционным фактором, который контролирует стабильность жизненно важных процессов, включая репарацию ДНК и апоптоз (Bensaad, 20007). Так в мозге рыб *Danio rerio* на фоне повышенной экспрессии белка p53 прекращается клеточный цикл и происходит разрушение поврежденных клеток (Ну, 2015). Принимая во внимание, что p53 и RPA1 участвуют в клеточном ответе, который инициирован цитотоксическими повреждениями, их экспрессия может отражать способность клеток головного мозга активировать компенсаторные механизмы для поддержания жизнеспособности. В качестве адекватного тест-объекта при изучении воздействия различных загрязняющих среду обитания веществ, в том числе и ртути, широко используется радужная форель (Ciardullo, 2008; Kenšová, 2012; Liu, 2013).

Целью настоящего исследования является изучение роли белков RPA1 и p53 в реакции клеток головного мозга радужной форели на воздействие сублетальных доз неорганической ртути.

### Материалы и методы

Модельный эксперимент нейротоксичности неорганической ртути проведен в лабораториях аквакультуры и молекулярной биологии Бингельского Университета. Радужная форель *Oncorhynchus mykiss* ( $59,43 \pm 3,73$  г и  $17,24 \pm 1,64$  см) была отобрана на рыбной ферме Кебан (г. Элазиг) и акклиматизирована в 600-литровых танках в течение 15 дней. Температура воды составляла  $14 \pm 3^\circ\text{C}$ , уровень растворенного кислорода –  $8,24 \pm 0,5$  мг/л,  $\text{pH} 7,3 \pm 0,2$ . Кормление рыбы осуществлялось кормами промышленного производства два раза в день, при этом суточная доза корма составляла 2% от веса животных.

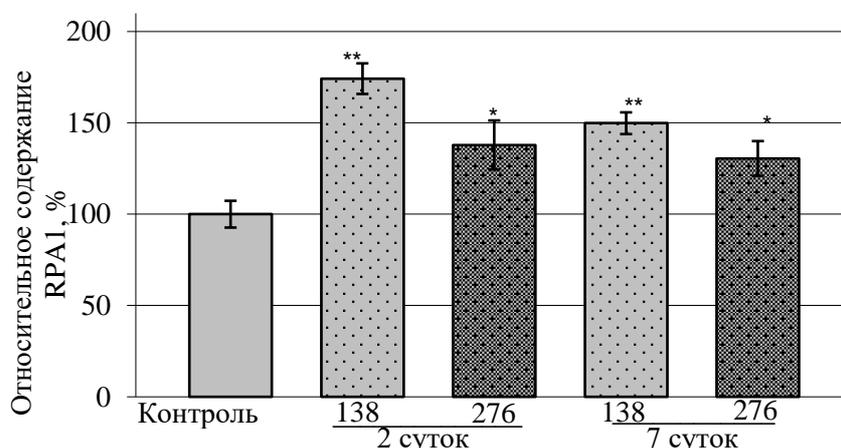
В соответствии с правилами определения величины  $\text{LK}_{50}$ , воздействию хлоридом ртути подвергали радужную форель в семи экспериментальных группах, с различной концентрацией  $\text{HgCl}_2$  (20, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 мкг/л). Эксперимент длился в течение 96 часов. Изменения жизнеспособности регистрировались 6 раз в сутки. Установлено, что 96-часовая  $\text{LK}_{50}$  хлорида ртути для радужной форели составляет 551 мкг/л. Сублетальные концентрации хлорида ртути определяли из расчета 25% и 50% от величины  $\text{LK}_{50}$ , что составляет 138 мкг/л и 276 мкг/л соответственно. Четыре контрольные группы рыб по 15 особей каждая, подвергались воздействию указанных сублетальных концентраций в течение 2-х и 7-ми суток. Две контрольные группы рыб, состоящие также из 15 особей, воздействию хлорида ртути не подвергались.

Отбор ткани мозга проводили в соответствии с требованиями местного этического комитета к работе с экспериментальными животными. Головной мозг рыб хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Для получения гомогената ткани мозга гомогенизировали в соотношении 1: 10 ткань/буфер (10 мм Трис-буфер ( $\text{pH} = 7,4$ ), 0,1 мм NaCl, 1% TritonX-100, 0,2% SDS, 2,5 мм этилендиаминтетрауксусной кислоты, 6,5 мкм апротинина, 1,5 мкм пепстатина а, 23 мкм лейпептина, 1 мм фенилметилсульфонилфторида, 1 мкм ортованадата натрия, 5 мкм ингибитора трипсина сои). Гомогенизацию и другие процедуры проводили на льду, чтобы предотвратить деградацию белка, вызванную повышением активности протеаз. После экстракции белка в течение 60 мин при температуре  $+4^\circ\text{C}$ , проводили центрифугирование при 60 000 об/мин (60 минут при температуре  $+4^\circ\text{C}$ ). Полученные супернатанты хранили при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Содержание АФК определяли флюорометрическим методом при окрашивании 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетатом (DCFH-DA). Каждый образец был протестирован в пяти параллелях. Иммуноблоттинг проводили с использованием электрофореза в полиакриламидном в геле (10% акриламида). После разделения белки переносили на поливинилиденфторидную (ПВДФ) мембрану, промывали PBS и

инкубировали в блокирующем буфере (3% BSA) в течение 60 мин. После блокировки, мембраны инкубировали в течение 10 час (при +4 °С) с соответствующими первичными антителами – анти-p53 (SantaCruzСанта-Круз, sc-126, разведение 1:1000), анти-RPA1 (SantaCruz, sc-48425, разведение 1:1000) и анти-β-актин (Abcam, ab8226, разведение 1:3000). После инкубации с первичными антителами мембрану трижды промывали Трис-буферным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (TBS-T). Промытые мембраны инкубировали с мышиными вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена (HRP) в течение 60 мин при комнатной температуре. После трехкратного промывания мембран раствором TBS-T они направлялись на визуализацию результатов вестерн-блоттинга (westernblot), которая проводилась на основе метода хемилюминесценции с использованием автоматического рентгеновского аппарата (Carestream HeathInc., США). Для сканирования пленок с результатами использовалась система визуализации BIO-RAD. Результаты оценивали методом денситометрии с использованием программы IMAGE-J. Статистический анализ изменений исследуемых параметров проводили с использованием программы SPSS20с помощью дисперсионного и множественного сравнительных тестов Дункана. Количественные данные представлялись в виде стандартного среднеквадратического отклонения от среднего значения ( $M \pm m$ ). Достоверность различий между группами оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента ( $P < 0,05$ ) после проверки гипотез о нормальности распределения и различии между генеральными дисперсиями.

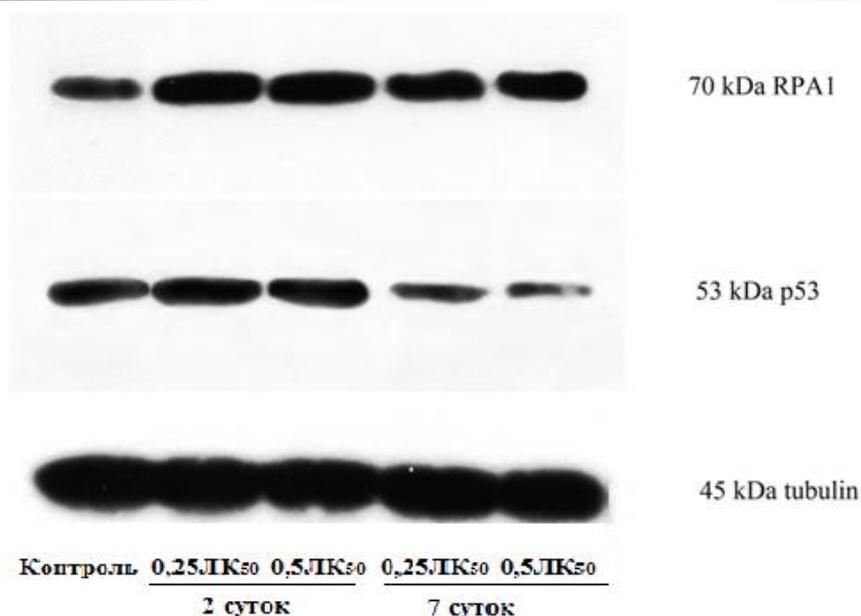
### Результаты

Известно, что интенсивность образования АФК и степень окислительного стресса являются следствием воздействия различных токсикантов. Учитывая эту особенность, уровень АФК определялся в головном мозге рыб всех групп. Данные измерения уровня АФК в головном мозге рыб, подвергшихся воздействию хлорида ртути, представлены в виде относительного содержания по сравнению с контрольными значениями (рис.1).



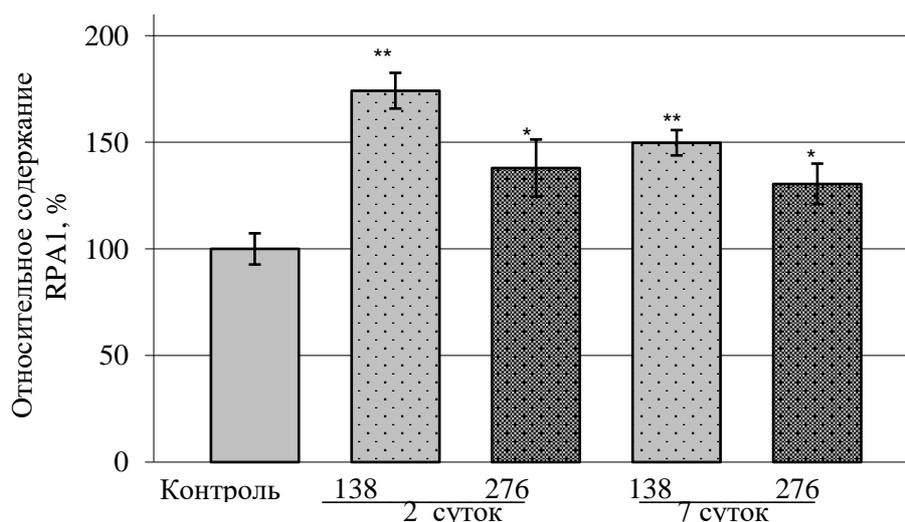
**Рис. 1.** Относительное содержание АФК в головном мозге радужной форели при воздействии сублетальных (138 и 276 мкг/л) концентраций хлорида ртути в течение 2-х и 7-ми суток: достоверность отличий экспериментальных групп относительно контрольной группы: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$

Установлено, что содержание АФК в головном мозге рыб всех исследуемых групп зависит как от концентрации неорганической ртути в среде обитания радужной форели, так и от продолжительности воздействия токсиканта. Данные иммуноблотинга, полученные при выявлении содержания протеинов RPA1 и p53 в головном мозге радужной форели после воздействия сублетальных концентраций хлорида ртути, представлены на рис. 2.



**Рис. 2.** Результаты иммуноблоттинга фракций белков мозга радужной форели, обитающей при воздействии сублетальных (138 и 276 мкг/л) концентраций хлорида ртути в течение 2-х и 7-ми суток

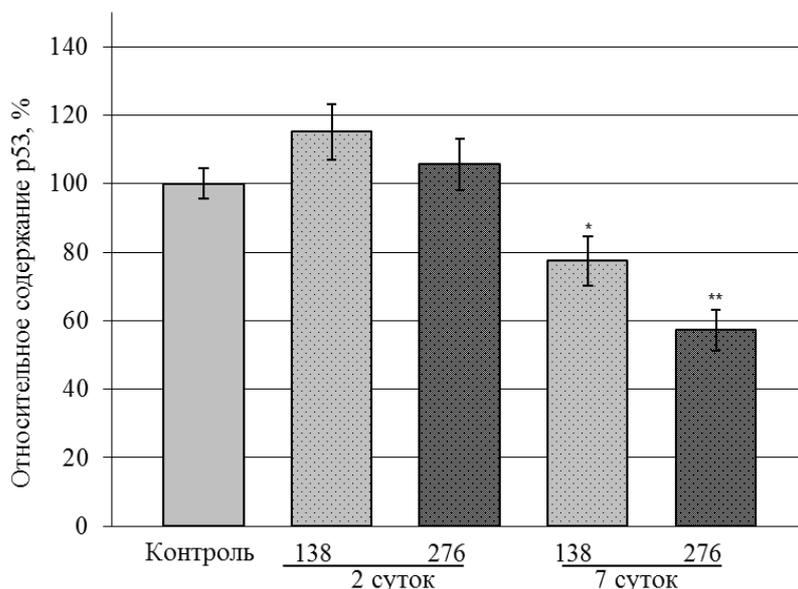
Выявлено, что содержание белка RPA1 в мозге всех экспериментальных групп радужной форели при воздействии хлорида ртути существенно повышалось. Причем хлорид ртути инициировал значительное увеличение экспрессии RPA1 в группах рыб, подвергавшихся менее продолжительному воздействию (2 сут). Неожиданный эффект выявлен при сравнительном анализе данных, полученных в экспериментальных группах, подверженных действию различных концентраций хлорида ртути (25% ЛК<sub>50</sub> и 50% ЛК<sub>50</sub>). Результаты исследования содержания протеина RPA1 в мозге контрольных и экспериментальных групп радужной форели представлены на рисунке 3.



**Рис. 3.** Относительное содержание белка RPA1 в головном мозге радужной форели при воздействии сублетальных (138 и 276 мкг/л) концентраций хлорида ртути в течение 2-х и 7-ми суток: достоверность отличий экспериментальных групп относительно контрольной группы: \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ .

Установлено, что воздействие меньшими дозами ртути (25% ЛК<sub>50</sub>) вызывает более интенсивное увеличение содержания протеина RPA1 в головном мозге рыб.

Результаты исследования содержания протеина р53 в мозге контрольных и экспериментальных групп радужной форели представлены на рисунке 4. Изменения экспрессии белка р53 происходили во всех экспериментальных группах. Причем, менее значительное увеличение содержания этого протеина наблюдалось в группе, обитающей при более низких концентрациях ртути как в течение 2-х, так и в течение 7-ми суток. Повышение концентрации неорганической ртути в среде обитания рыб индуцировало более высокую экспрессию белка р53.



**Рис. 4.** Относительное содержание белка р53 в головном мозге радужной форели при воздействии сублетальных (138 и 276 мкг/л) концентраций хлорида ртути в течение 2-х и 7-ми суток: достоверность отличий экспериментальных групп относительно контрольной группы: \* -  $P < 0,05$

Полученные результаты указывают на то, что присутствие неорганической ртути в среде обитания радужной форели индуцирует достоверное повышение генерации АФК и увеличение содержания стресс-регулирующих белков RPA1 и р53 в головном мозге рыб.

### Обсуждение

Известно, что токсическое воздействие ртути характеризуется специфическими клеточными повреждениями. Одной из важных особенностей такой интоксикации является способность связываться с тиоловыми группами различных органических молекул (Szunyogh, 2015). Обладая высоким сродством к HS-группам, ртуть может повреждать аминокислоты, которые являются субстратом для биосинтеза мощного антиоксиданта головного мозга – глутатиона, способного препятствовать генерации окислительного стресса (Carocci, 2014; Rensburg, 2019). Наиболее восприимчивы к окислительным повреждениям клетки головного мозга, так как для них характерно интенсивное потребление кислорода и низкий уровень антиоксидантной защиты. Поэтому, весьма вероятно, что воздействие ионов ртути может индуцировать повышение клеточного уровня АФК и, как следствие, необратимые нарушения в клетках мозга. Показано снижение числа нейронов и глиоцитов в головном мозге морского окуня, обитавшего в течение 7-ми суток в среде с содержанием ртути 2 мкг/л. Дегенерация клеток сопровождалась функциональными изменениями мозга, приводящими к нарушениям двигательного аппарата (Pereira, 2016). Очевидно, клеточная гибель при воздействии ртути может быть вызвана подавлением транскрипционной активности и

ограничением репарации разрывов ДНК, что, в свою очередь, может привести к геномной нестабильности и активации процессов апоптоза. Однако, весомых доказательств прямой нейротоксичности неорганических форм ртути в настоящее время нет. Полученные в представленной работе результаты, свидетельствующие о резком снижении содержания протеина p53 в головном мозге рыб, подвергнутых воздействию хлорида ртути в концентрации 50% ЛК<sub>50</sub>, можно расценивать как показатель необратимого нарушения основных регуляторных путей.

Семейство белков RPA представлено высоко консервативными протеинами, которые присутствуют практически в каждой эукариотической клетке (Wold, 1997; Ishibashi, 2001). Доменная структура RPA сходна у всех живых организмов (Wold, 1997; Iftode, 1999). Вместе с другими белками репликации ДНК эти протеины поддерживают стабильность тринуклеотидных повторов CAG/CTG, что обеспечивает нормальное функционирование мозга (Mason, 2014). В формировании третичной структуры наиболее значимой субъединицы протеина RPA принимают участие ионы цинка. Цинк-связывающий домен субъединицы RPA1 поддерживает нативную конформацию нуклеопротеиновых комплексов, образуемых во время репарации ДНК (Eckerich, 2001). Некоторые тяжелые металлы, в частности кадмий и ртуть, могут конкурировать с цинком за связывание с RPA1 (Jancsy, 2013; Szunyogh, 2015). Можно предположить, что ионы ртути вытесняют цинк из структуры RPA1 и провоцируют изменение конформации белка, нарушая механизм репарации ДНК. Результаты данного исследования по сверхэкспрессии RPA1, инициированной воздействием сублетальных доз ртути в головном мозге радужной форели, свидетельствуют о высокой чувствительности механизма репликации ДНК к нейротоксическому воздействию.

Белок p53 участвует в регуляции многих жизненно важных процессов, включая клеточный цикл, инициацию апоптоза, транскрипционную активность и репарацию ДНК (Hu, 2007; Lieberman, 2017). Недавние работы содержат доказательства того, что протеин p53 регулирует экспрессию генов для поддержания эффективности адаптации клеток к условиям окружающей среды (Marcel, 2018; Jiang, 2019). Одной из основных функций p53 является контроль клеточного цикла и программируемой гибели клеток в ответ на окислительные повреждения (Fuschi, 2017).

Жизнеспособность клеточных структур, при интоксикации сублетальными дозами неорганической ртути, зависит от эффективности клеточного ответа, который может обеспечить выживание или запрограммированную гибель клеток для предотвращения некроза. Сравнительно недавно появились данные о том, что клеточный ответ на разрывы ДНК сопровождается скачкообразными изменениями в содержании белка p53 (Porter, 2017). Такой механизм модуляции p53 регулирует клеточную реакцию при повреждении ДНК.

Таким образом, повышенная экспрессия RPA1 может быть одним из индикаторов клеточной адаптации к токсичному действию ртути в клетках мозга рыб. Представленные результаты указывают на наличие взаимосвязи между Hg-индуцированной генерацией АФК и модуляцией содержания протеинов p53 и RPA1 при клеточном ответе на цитотоксичность ртути в головном мозге радужной форели.

## **Выводы**

Выявленные изменения экспрессии белков p53 и RPA1 ассоциированы с генерацией окислительного стресса у рыб, вызванного воздействием сублетальных концентраций неорганической ртути. Повышение содержания RPA1 в головном мозге животных является составляющей клеточного ответа на повреждения ДНК. Увеличение экспрессии RPA может служить маркером нарушений ДНК при ртутной интоксикации. Резкое снижение содержания протеина p53 в мозге радужной форели, в присутствии

сублетальных концентраций хлорида ртути (50% ЛК<sub>50</sub>), вероятно, связано с необратимыми нарушениями функций этого белка. Последующие исследования нейротоксичности ртути для различных видов гидробионтов имеет большое значение для мониторинга потенциального риска загрязнения окружающей среды ртуть-содержащими соединениями.

### Список литературы

1. *Amlund H., Lundebye A.K., Berntssen M.H.* Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure // *Aquat Toxicol.* – 2007. – V. 83(4). – P. 323–30.
2. *Antunes Dos Santos A., Ferrer B., Marques Gonçalves F., Tsatsakis A.M., Renieri E.A., Skalny A. V., Farina M., Rocha J. T., Aschner M.* Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Cell Toxicity // *Toxics.* – 2018. – V. 6(3). – P. 47–50. doi: 10.3390/toxics6030047.
3. *Bensaad K., Vousden K.H.* p53: new roles in metabolism // *Trends Cell Biol.* – 2007. – V. 17(6). – P. 286–291.
4. *Brandão F., Cappello T., Raimundo J., Santos M.A., Maisano M., Mauceri A., Pacheco M., Pereira P.* Unravelling the mechanisms of mercury hepatotoxicity in wild fish (*Liza aurata*) through a triad approach: bioaccumulation, metabolomic profiles and oxidative stress // *Metallomics.* – 2015. – V. 7(9). – P. 1352–1363.
5. *Cariccio V.L., Sama A., Bramanti P., Mazzon E.* Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases // *Biol Trace Elem Res.* – 2019. – V. 187(2). – P. 341–356.
6. *Carocci A., Rovito N., Sinicropi M.S., Genchi G.* Mercury toxicity and neurodegenerative effects // *Rev Environ Contam Toxicol.* – 2014. – V. 229. P. 1–18. doi: 10.1007/978-3-319-03777-6\_1.
7. *Chang Y., Lee W.Y., Lin Y.J., Hsu Mercury T.* (II) impairs nucleotide excision repair (NER) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos by targeting primarily at the stage of DNA incision // *Aquat Toxicol.* – 2017. – V. 192. – P. 97–104.
8. *Choi J.H., Lindsey-Boltz L.A., Kemp M., Mason A.C., Wold M.S., Sancar A.* Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107(31). – P. 13660–13665.
9. *Ciardullo S., Aureli F., Coni E., Guandalini E., Iosi F., Raggi A., Rufo G., Cubadda F.* Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury, and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth // *J Agric Food Chem.* – 2008. – V. 56(7). – P. 2442–2451. doi: 10.1021/jf703572t.
10. *Eagles-Smith C.A., Ackerman J.T., Willacker J.J., Tate M.T., Lutz M.A., Fleck J.A., Stewart A.R., Wiener J.G., Evers D.C., Lepak J.M., Davis J.A., Pritz C.F.* Spatial and temporal patterns of mercury concentrations in freshwater fish across the Western United States and Canada // *Sci Total Environ.* – 2016. – V. 568. P. 1171–1184. doi: 10.1016/j.scitotenv.
11. *Eagles-Smith C.A., Wiener J.G., Eckley C.S., Willacker J.J., Evers D.C., Marvin-DiPasquale M., Obrist D., Fleck J.A., Aiken G.R., Lepak J.M., Jackson A.K., Webster J.P., Stewart A.R., Davis J.A., Alpers C.N., Ackerman J.T.* Mercury in western North America: A synthesis of environmental contamination, fluxes, bioaccumulation, and risk to fish and wildlife // *Sci Total Environ.* – 2016. – V. 568. – P. 1213–1226. doi: 10.1016/j.scitotenv.
12. *Eckerich C., Fackelmayer F.O., Knippers R.* Zinc affects the conformation of nucleoprotein filaments formed by replication protein A (RPA) and long natural DNA molecules // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. – V. 1538(1). – P. 67–75.
13. *Fuschi P., Carrara M., Voellenkle C., Garcia-Manteiga J. M., Righini P., Maimone B., Sangalli E., Villa F., Specchia C., Picozza M., Nano G., Gaetano C., Spinetti G., Puca A. A., Magenta A., Martelli F.* Central role of the p53 pathway in the noncoding-RNA response to oxidative stress // *Aging (Albany NY).* – 2017. – V. 12(9). – P. 2559–2586.

14. Giblin F.J., Massaro E.J. The erythrocyte transport and transfer of methylmercury to the tissues of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Toxicology*. – 1975. – V. 5. – P. 243–254.
15. Gymez-Olivon L.M., Mendoza-Zenil Y.P., SanJuan-Reyes N., Galar-Martinez M., Ramirez-Duron N., Rodriguez Martin-Doimeadios R.C., Rodriguez-Faricas N., Islas-Flores H., Elizalde-Velozquez A., Garcia-Medina S. Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof // *Ecotoxicol Environ Saf*. – 2017. – V. 135. – P. 98–105.
16. Has-Schön E., Bogut I., Vuković R., Galović D., Bogut A., Horvatić J. Distribution and age-related bioaccumulation of lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd), and arsenic (As) in tissues of common carp (*Cyprinus carpio*) and European catfish (*Sylurus glanis*) from the Вуљко Влато reservoir (Bosnia and Herzegovina) // *Chemosphere*. – 2015. – V. 135. – P. 289–296.
17. Horowitz H.M., Jacob D.J., Amos H.M., Streets D.G., Sunderland E.M. Historical Mercury releases from commercial products: global environmental implications // *Environ Sci Technol*. – 2014. – V. 48(17). – P. 10242–10250. doi: 10.1021/es501337j.
18. Hu J., Liu Z.S., Tang S.L., He Y.M. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the growth and p53/c-Myc protein expression of implanted hepatic VX2 tumor in rabbits by intravenous injection // *World J Gastroenterol*. – 2007. – V. 13(20). – P. 2798–2802.
19. Hu Z., Holzschuh J., Driever W. Loss of DDB1 Leads to Transcriptional p53 Pathway Activation in Proliferating Cells, Cell Cycle Dereglulation, and Apoptosis in Zebrafish Embryos // *PLoS One*. – 2015. – V. 10(7). – e0134299. doi: 10.1371/journal.pone.0134299.
20. Iftode C., Daniely Y., Borowiec J.A. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. – 1999. – V. 34(3). – P. 141–180.
21. Ishibashi T., Kimura S., Furukawa T., Hatanaka M., Hashimoto J., Sakaguchi K. Two types of replication protein A 70 kDa subunit in rice, *Oryza sativa*: molecular cloning, characterization, and cellular & tissue distribution // *Gene*. – 2001. – V. 272(1–2). – P. 335–343.
22. Jancsy A., Gyurcsik B., Mesterhozy E., Berkecz R. Competition of zinc(II) with cadmium(II) or mercury(II) in binding to a 12-mer peptide // *J Inorg Biochem*. – 2013. – V. 126. – P. 96–103.
23. Jiang D., Rusling J.F. Oxidation Chemistry of DNA and p53 Tumor Suppressor Gene // *Chemistry Open*. – 2019. – V. 8(3). – P. 252–265.
24. Kenšová R., Kružiková K., Havránek J., Haruštiaková D., Svobodová Z. Distribution of mercury in rainbow trout tissues at embryo-larval and juvenile stages // *Scientific World Journal*. – 2012. V. 20. – P.652–666. doi: 10.1100/2012/652496.
25. Lieberman H.B., Panigrahi S.K., Hopkins K.M., Wang L., Broustas C.G. p53 and RAD9, the DNA Damage Response, and Regulation of Transcription Networks // *Radiat Res*. – 2017. – V. 187(4). – P. 424–432.
26. Liu Q., Basu N., Goetz G., Jiang N., Hutz R. J., Tonellato P.J., Carvan M.J. Differential gene expression associated with dietary methylmercury (MeHg) exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*) // *Ecotoxicology*. – 2013. – V. 22 (4). – P. 740–751. doi: 10.1007/s10646-013-1066-9.
27. Lohren H., Bornhorst J., Fitkau R., Pohl G., Galla H.J., Schwerdtle T. Effects on and transfer across the blood-brain barrier in vitro-Comparison of organic and inorganic mercury species // *BMC Pharmacol Toxicol*. – 2016. – V. 17(1). – P. 63.
28. Marcel V., Nguyen Van Long F., Diaz J. J. Years of Research Put p53 in Translation // *Cancers (Basel)*. – 2018. – V. 10(5). – P.21.
29. Mason A.G., Tom S., Simard J.P., Libby R.T., Bammler T.K., Beyer R.P., Morton A.J., Pearson C.E., La Spada A.R. Expression levels of DNA replication and repair genes predict regional somatic repeat instability in the brain but are not altered by polyglutamine disease protein expression or age // *Hum Mol Genet*. – 2014. – V. 23(6). – P. 1606–1618.
30. Meena R.A., Sathishkumar P., Ameen F., Yusoff A.M., Gu F.L. Heavy metal pollution in immobile and mobile components of lentic ecosystems-a review // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2017. – V. 25(5). – P. 4134–4148. doi: 10.1007/s11356-017-0966-2.

31. *Mieiro C.L., Pacheco M., Pereira M E., Duarte A.C.* Mercury organotropism in feral European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) // *Arch Environ Contam Toxicol.* – 2011. – V. 61(1). – P. 135–143. doi: 10.1007/s00244-010-9591-5.
32. *Monnet-Tschudi F., Zurich M.G., Honegger P.* Comparison of the developmental effects of two mercury compounds on glial cells and neurons in aggregate cultures of rat telencephalon // *Brain Res.* – 1996. – V. 741(1-2). – P. 52–59.
33. *Obrist D., Kirk J.L., Zhang L., Sunderland E.M., Jiskra M., Selin N.E.* A review of global environmental mercury processes in response to human and natural perturbations: Changes of emissions, climate, and land use // *Ambio.* – 2018. – V. 47(2). – P. 116–140. doi: 10.1007/s13280-017-1004-9.
34. *Ohgoh M., Shimizu H., Ogura H., Nishizawa Y.* Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons // *J Neurochem.* – 2000. – V. 75(3). – P. 925–933.
35. *Orihel D.M., Paterson M.J., Blanchfield P.J., Bodaly R.A., Hintelmann H.* Experimental evidence of a linear relationship between inorganic mercury loading and methylmercury accumulation by aquatic biota // *Environ Sci Technol.* – 2007. – V. 41(14). – P. 4952–4958.
36. *Pereira P., Raimundo J., Arajo O., Canorio J., Almeida A., Pacheco M.* Fish eyes and brain as primary targets for mercury accumulation – a new insight on environmental risk assessment // *Sci Total Environ.* – 2014. – V. 8. – P. 494–495.
37. *Pereira P., Raimundo J., Barata M., Arajo O., Pouszo-Ferreira P., Canorio J., Almeida A., Pacheco M.* A new page on the road book of inorganic mercury in fish body - tissue distribution and elimination following waterborne exposure and post-exposure periods // *Metallomics.* – 2015. – V. 7(3). P. 525–535.
38. *Pereira P., Puga S., Cardoso V., Pinto-Ribeiro F., Raimundo J., Barata M., Pouszo-Ferreira P., Pacheco M., Almeida A.* Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream-*Diplodus sargus*) // *Aquat Toxicol.* – 2016. – V. 170. P. 400–412.
39. *Pillet M., Castaldo G., De Weggheleire S., Bervoets L., Blust R., De Boeck G.* Limited oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*, L., 1758) exposed to a sublethal tertiary (Cu, Cd and Zn) metal mixture // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* – 2019. – V. 218. – P. 70–80.
40. *Porter J.R., Fisher B.E., Baranello L., Liu J.C., Kambach D.M., Nie Z., Koh W.S., Luo J., Stommel J.M., Levens D., Batchelor E.* Global Inhibition with Specific Activation: How p53 and MYC Redistribute the Transcriptome in the DNA Double-Strand Break Response // *Mol Cell.* – 2017. – V. 67(6). – P. 1013–1025.
41. *Rensburg M.J., Rooy M., Bester M.J., Serem J.C., Venter C., Oberholzer H.M.* Oxidative and haemostatic effects of copper, manganese and mercury, alone and in combination at physiologically relevant levels: An ex vivo study // *Hum Exp Toxicol.* – 2019. – V. 38(4). – P. 419–433.
42. *Santovito G., Piccinni E., Boldrin F., Irato P.* Comparative study on metal homeostasis and detoxification in two Antarctic teleosts // *Comp Biochem Physiol.* – 2012. – V. 155. – P. 580–586.
43. *Simmons S.O., Fan C.Y., Yeoman K., Wakefield J., Ramabhadran R.* NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent // *Curr Chem Genomics.* – 2011. V. 12(1). P. 5. doi: 10.2174/1875397301105010001.
44. *Simon O., Boudou A.* Direct and trophic contamination of the herbivorous carp *Ctenopharyngodon idella* by inorganic mercury and methylmercury // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2001. – V. 50(1). – P. 48–59.
45. *Szunyogh D., Gyurcsik B., Larsen F.H., Stachura M., Thulstrup P.W., Hemmingsen L., Jancsy A.* Zn(II) and Hg(II) binding to a designed peptide that accommodates different coordination geometries // *Dalton Trans.* – 2015. – V. 44(28). – P. 12576–12588.

46. *Tolomeo K.* Joint Commission on Hospital Accreditation. More on Managing Hazardous Materials and Waste // *J Comm Perspect.* – 2016. – V. 36(1). – P. 13–14.
47. *Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullas M.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2006. – V. 64(2). P. 178–189.
48. *Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.* Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // *Environ Toxicol Pharmacol.* – 2003. – V. 13. – P. 149–157.
49. *Vieira L.R., Gravato C., Soares A.M., Morgado F., Guilhermino L.* Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior // *Chemosphere.* – 2009. – V. 76(10). – P. 1416–1427. doi: 10.1016/j.
50. *Wang W.X., Wong R.K.* Bioaccumulation kinetics and exposure pathways of inorganic mercury and methylmercury in a marine fish, the sweetlips *Plectorhinchus gibbosus* // *Marine Ecology Progress Series.* – 2003. – V. 261. – P. 257–268.
51. *Wold M.S.* Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism // *Annu Rev Biochem.* – 1997. – V. 66. – P. 61–92.
52. *Zheng W., Aschner M., Gherzi-Egea J.F.* Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2003. – V. 192(1). – P. 1–11.
53. *Zou L., Elledge S.J.* Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes // *Science.* – 2003. – V. 5625(6). – P. 1542–1548.

#### THE EFFECT OF INORGANIC MERCURY ON RPA1 AND P53 EXPRESSION IN THE BRAIN OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS*

Sukhareenko E.V.<sup>1</sup>, Nedzvetsky V.S.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Kerch State Maritime Technological University, Kerch, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Bingöl University, Bingöl, Turkey*

<sup>3</sup>*Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, Ukraine,*

e-mail: [helenasuhar@gmail.com](mailto:helenasuhar@gmail.com), [nedzvetskyvictor@gmail.com](mailto:nedzvetskyvictor@gmail.com)

The study was carried out with Rainbow trout exposed to inorganic mercury 25% LC<sub>50</sub> and 50% LC<sub>50</sub> for 2 and 7 days. Obtained results have shown that downregulation of p53 level accompanied with upregulation of RPA1 in the brain of fish treated with sublethal dose. Therefore, upregulation of RPA1 expression could be one of critic factor of cell adaptation in stressed with inorganic Hg fish brain. Taking together presented in our study results, we can assume the presence of interaction between Hg-induced ROS generation and the modulation of both p53 and RPA1 content during cellular response to mercury cytotoxicity in a rainbow trout brain. Presented results in our study are reported the first time that a lack of p53 and upregulation of RPA1 in fish brain after inorganic Hg exposure. The revealed RPA1 upregulation in fish brain could serve at least a part of cellular response to DNA breaks caused by inorganic Hg.

**Key words:** inorganic mercury; RPA1; p53; neurotoxicity; environment pollution; Rainbow trout.

Сухаренко  
Елена  
Валериевна

Доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры водных биоресурсов и марикультуры, ФГБОУ ВО «Керченский государственный морской технологический университет», e-mail: [helenasuhar@gmail.com](mailto:helenasuhar@gmail.com)

Недзвецкий  
Виктор  
Станиславович

Доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и генетики, Бингельский государственный университет, e-mail: [nedzvetskyvictor@gmail.com](mailto:nedzvetskyvictor@gmail.com)

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.