# ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ $Ca^{2+}$-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ *MYTILUS EDULIS* L. В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

**Н. П. Канцерова [1], Л. А. Лысенко [1], Н. Н. Немова [1,2], В. В. Осташкова [2]**
[1]Учреждение Российской Академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия
[2] Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск
e-mail: nkantserova@yandex.ru

Тяжелые металлы (ртуть, кадмий, свинец, медь, цинк и некоторые другие) – одни из основных поллютантов, поступающих в морскую среду, главным образом, с атмосферными осадками и в процессе таяния снега. Им свойственны высокая биологическая активность, способность к аккумуляции в организме без уменьшения токсичности, легкость биопереноса в окружающей среде. Все возрастающее антропогенное загрязнение различных экосистем, в том числе морских, делает актуальным изучение механизмов воздействия тяжелых металлов на организмы.

Известно, что токсичность тяжелых металлов, в основном, определяется их ингибирующим действием на ферментативную активность. Комплексы ферментов с ионами тяжелых металлов устойчивы, и ингибирование принимает необратимый характер. Так, ионы тяжелых металлов могут образовывать прочные комплексы с аминокислотами и другими биомолекулами, содержащими тио- (SH-) или алкилтиогруппировки (RS-). К типу цистеиновых (содержащих SH-группы цистеина в активном центре) протеиназ относятся кальпаины, или $Ca^{2+}$-зависимые протеолитические ферменты цитозоля. В эксперименте *in vitro* продемонстрировано (Ladrat et al., 2002), что ионы кобальта, никеля, кадмия и ртути вызывают полную инактивацию кальпаинов из тканей рыб. Однако, по всей видимости, механизм взаимодействия ионов металлов с изучаемыми цистеиновыми протеиназами может реализовываться не только за счет SH-групп их активного центра, но и за счет конкуренции этих ионов с кальцием на кальций–зависимых этапах функционирования кальпаинов. Так, способность некоторых металлов (стронция, бария) активировать кальпаины, аналогично кальцию, также была продемонстрирована в эксперименте *in vitro* (Ladrat et al., 2002).

В практике биохимического мониторинга большой интерес представляет изучение свойств и уровня активности $Ca^{2+}$-зависимых протеолитических ферментов при действии тяжелых металлов *in vivo*. Как указывалось выше, SH-группы активного центра кальпаинов могут выполнять роль специфичных лигандов для ионов тяжелых металлов, кроме того, ионы металлов главной подгруппы II группы (стронция, бария) могут замещать кальций – основной регулятор активности кальпаинов.

В ранее проведенных экспериментах нами неоднократно было показано, что внутриклеточные протеолитические ферменты, в том числе кальпаины, играют важную роль в развитии физиолого–биохимической адаптации живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Такая адаптация подразумевает не только синтез новых ферментов и белков, обеспечивающих изменившиеся метаболические потребности клетки, но и распад и удаление тех биомолекул, которые больше не нужны для ее нормального функционирования. В ряде случаев изменение свойств и уровня активности протеолитических ферментов имеет адаптивный характер и может свидетельствовать о приспособлении организма к изменяющимся условиям окружающей среды, в других – о развитии тканевой патологии, обычно тесно связанной с нарушением базального уровня внутриклеточного кальция.

Одними из наиболее удобных объектов для изучения влияния ксенобиотиков, в том числе тяжелых металлов, признаны морские беспозвоночные. В сравнении с позвоночными животными многие виды моллюсков обладают слаборазвитой способностью к биотрансформации ксенобиотиков. Важные характеристики мидий как объектов токсикологических исследований – высокая способность к аккумуляции загрязнителей из среды в тканях и сравнительно низкая активность системы цитохрома P 450 (Fung et al., 2004). В настоящей работе изучали активность внутриклеточных $Ca^{2+}$-зависимых протеиназ (кальпаинов) мидий *Mytilus edulis* L. при воздействии ионов тяжелых металлов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В эксперименте *in vitro* были протестированы металлы, обладающие, согласно литературным данным, сродством к кальпаинам рыб. В условиях аквариального эксперимента моллюски подвергались воздействию кадмия, способного связываться с SH-группами биомолекул, и меди – эссенциального металла, в высоких концентрациях токсичного для организма (Губанов и др., 2008).

## Материалы и методы исследования

Аквариальный эксперимент был выполнен на одноразмерных мидиях *Mytilus edulis* L., отловленных на сублиторали в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря. После акклимации к лабораторным условиям (16-литровые аквариумы с естественным температурным и световым режимом, составом воды и оксигенацией) мидии были разделены на 7 групп, которые подвергали воздействию растворов солей (хлоридов) меди и кадмия (концентрация приведена в пересчете на катион): группа 1 – 5 мкг/л $Cu2^+$, группа 2 – 50 мкг/л $Cu2^+$, группа 3 – 250 мкг/л $Cu2^+$, группа 4 – 10 мкг/л $Cd2^+$, группа 5 – 100 мкг/л $Cd2^+$, группа 6 – 500 мкг/л $Cd2^+$. Контролем служили моллюски, содержащиеся в аквариуме без добавления металлов (группа 7). Экспозиция опыта составила 24 и 72 часа. Из каждой экспериментальной группы отбирали для дальнейшего анализа по 7 особей. Отпрепарированные органы (жабры, гепатопанкреас) хранили при -80 °С до начала анализа.

Активность кальпаинов определяли во фракциях цитоплазматических белков и микрочастиц (мембраносвязанных белков) (Enns, Belcastro, 2006). Методика позволяет тестировать активность кальпаинов без предварительного гель-хроматографического разделения белков, что важно при работе с малым объемом биологического материала.

Образцы тканей (~ 100 мг) гомогенизировали в 10-кратном объеме 20 мМ трис–HCl буфера (pH 7,5) с добавлением 80 мМ KCl, 5 мМ натриевой соли ЭДТА и 20 мМ дитиотреитола (ДТТ). В супернатанте после центрифугирования (20 000 g, 20 мин.) определяли активность кальпаинов (цитозольная фракция). Осадок ресуспендировали в 10 объемах того же буфера с добавлением 0,33% тритона X-100, в супернатанте после повторного центрифугирования в тех же условиях также определяли активность кальпаинов (мембраносвязанная фракция фермента). $Ca^{2+}$-зависимую протеолитическую активность кальпаинов оценивали по гидролизу щелочно-денатурированного казеина. К реакционной смеси (50 мМ трис-HCl буфер (pH 7,5), 1 мг/мл казеина, 20 мМ ДТТ) добавляли 200 мкл одной из фракций (конечный объем 500 мкл) и 5 мМ CaCl2 для активации кальпаинов (в контроль – 5 мМ ЭДТА). После 30-минутной инкубации при 28 °С отбирали аликвоты 100 мкл, в которых определяли содержание остаточного белка по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Единица активности кальпаинов определялась как количество фермента, вызывающее увеличение на 0,1 оптического поглощения при 595 нм за 1 час инкубации при 28 °С.

Активность кальпаинов при взаимодействии *in vitro* с ионами тяжелых металлов определяли после предварительной гель-хроматографии образцов на колонках с сефакрилом S300, уравновешенным буфером А (10 mM трис-HCl (pH 7,5), 4 mM ЭДТА, 5 mM 2-меркаптоэтанола, 50 mM NaCl). Наносили на колонку экстракты мягкого тела мидий, полученные после гомогенизации и центрифугирования (105 000 g, 60 мин) в буфере А, содержащем 0,25 М сахарозы. Элюцию белков проводили со скоростью 24 мл/ч буфером А. Активность $Ca^{2+}$-зависимых протеиназ во фракциях элюента (4,0 мл) определяли стандартным методом по гидролизу щелочно-денатурированного казеина (Murachi et al, 1981). Реакционная смесь включала 50 мМ имидазол-HCl буфера (pH 7,5), 0,4% казеина, 5 мМ дитиотреитола, 2,5 мМ CaCl2, в контрольные пробы кальций добавляли после инкубации. После инкубации (28 °С, 30 мин.) реакцию останавливали добавлением равного количества 10% трихлоруксусной кислоты. Концентрацию кислоторастворимых продуктов определяли при 280 нм. Единица активности кальпаинов определялась как количество фермента, вызывающее увеличение на 1,0 оптического поглощения при 280 нм за 1 час инкубации при 28 °С (Murachi et al, 1981).

Для оценки действия различных катионов на активность кальпаинов в обычной реакционной смеси $CaCl_2$ заменяли на хлорид исследуемого металла ($Ca^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd2^+$, $Cu^{2+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Fe^{3+}$) в конечной концентрации 2,5 мМ (контроль – 2,5 мМ $CaCl_2$). Эффект 2,5 мМ каждого катиона был также определен в присутствии 2,5 мМ $CaCl_2$ (контроль – 5 мМ $CaCl_2$).

Результаты исследований были обработаны статистически при помощи непараметрического критерия U (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) (Гублер, Генкин, 1969).

## Результаты и обсуждение

Активность препарата кальпаинов из мягкого тела мидий была измерена в присутствии ионов различных металлов ($Ca^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd2^+$, $Cu^{2+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Fe^{3+}$). Эффект, оказываемый различными катионами, варьировал от активации, сродни индуцируемой кальцием, до полного ингибирования. Как показано на рисунке 1, $Ca^{2+}$ в концентрации 2,5 мМ является наиболее эффективным активатором кальпаинов. Фермент также активируется в присутствии

2,5 мМ $Ba^{2+}$ до 70% от уровня активности, индуцированной действием $Ca^{2+}$. Ионы $Cu^{2+}$ и $Mg^{2+}$ также способны активировать фермент, но в значительно меньшей степени. В присутствии 2,5 мМ $Cd2^{+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$ и $Fe^{3+}$ активность фермента не выявлялась. Сочетанное действие $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ приводило к сильному ингибированию кальций-индуцируемой активности, $Ca^{2+}$ и $Cd2^{+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Fe^{3+}$ – к полной инактивации.

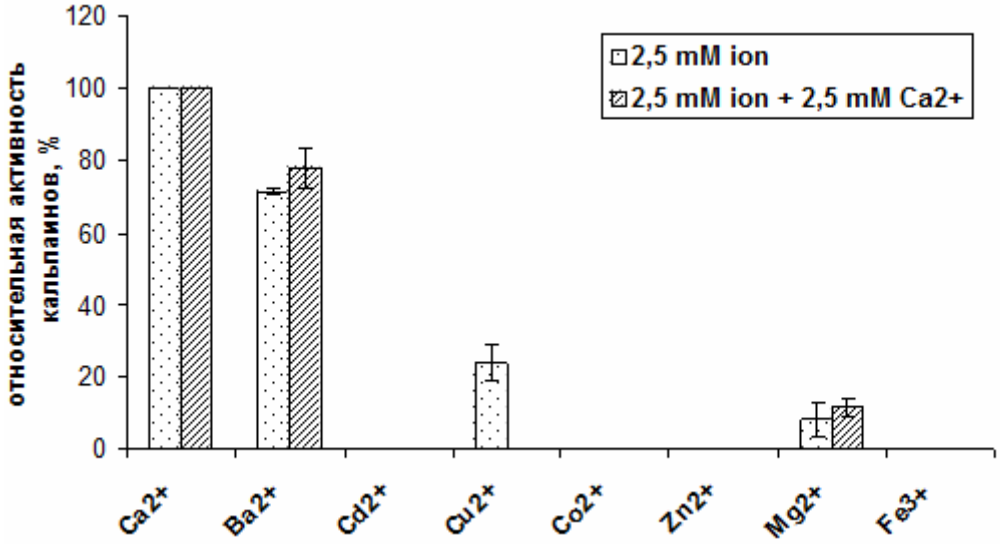


*Рис. 1.* Относительная активность кальпаинов мягкого тела мидии *Mytilus edulis* L. в присутствии различных катионов

В целом, результаты изучения активности кальпаинов мидий в присутствии различных катионов сходны с данными Ladrat et al. (2002), полученными для m-кальпаина из мышц морского окуня. По данным литературы (Ladrat et al., 2002, Gaitanaki et al., 2003), $Ba^{2+}$ и $Sr2^{+}$ способны активировать кальпаины, выделенные из тканей разных организмов. Сходная способность катионов $Ca^{2+}$, $Sr2^{+}$, $Ba^{2+}$ к активации кальпаинов объясняется их структурным родством, на основании которого они объединены в одну группу химических элементов периодической системы. Известно, что повышенная способность стронция к аккумуляции в организме обусловлена замещением $Ca^{2+}$ в костной и других тканях. Следствием этого является нарушение обмена $Ca^{2+}$ в организме и нарушение $Ca^{2+}$-зависимых регуляторных процессов, что определяет токсическое действие $Sr2^{+}$. Катионы $Cd2^{+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$ и $Fe^{3+}$ не способны индуцировать активность кальпаинов мидий, также они подавляют кальций-индуцированную активность кальпаинов, по всей видимости, блокируя SH-группу активного центра фермента.

На рисунках 2 и 3 представлены данные по изменению активности внутриклеточных $Ca^{2+}$-зависимых протеиназ в жабрах и гепатопанкреасе мидий при воздействии солей меди и кадмия в эксперименте *in vivo*. Активность кальпаинов в органах изменялась в зависимости от концентрации и времени воздействия металла на организм. Так, по истечении первых суток воздействия меди и кадмия наблюдался более высокий уровень активности кальпаинов в жабрах по сравнению с контролем. Можно предположить, что наблюдаемая активация кальпаинов в жабрах мидий при кратком воздействии тяжелых металлов сопутствует развитию неспецифической компенсаторной реакции, направленной на приспособление организма к высоким концентрациям изучаемых поллютантов в среде. После трех суток воздействия меди и кадмия происходило снижение активности $Ca^{2+}$-зависимых протеиназ в жабрах мидий по сравнению с контролем. Согласно литературным данным (Челомин, 1998), в условиях острого эксперимента у мидий наблюдается диспропорция в аккумуляции металлов, в результате которой основная нагрузка ложится на клетки жабр. Вероятно, вследствие этого, суточное воздействие металлов приводит к повышению уровня активности кальпаинов в жабрах мидий, а более длительное (3 суток), предполагающее возможное перераспределение металла в организме, – к снижению.

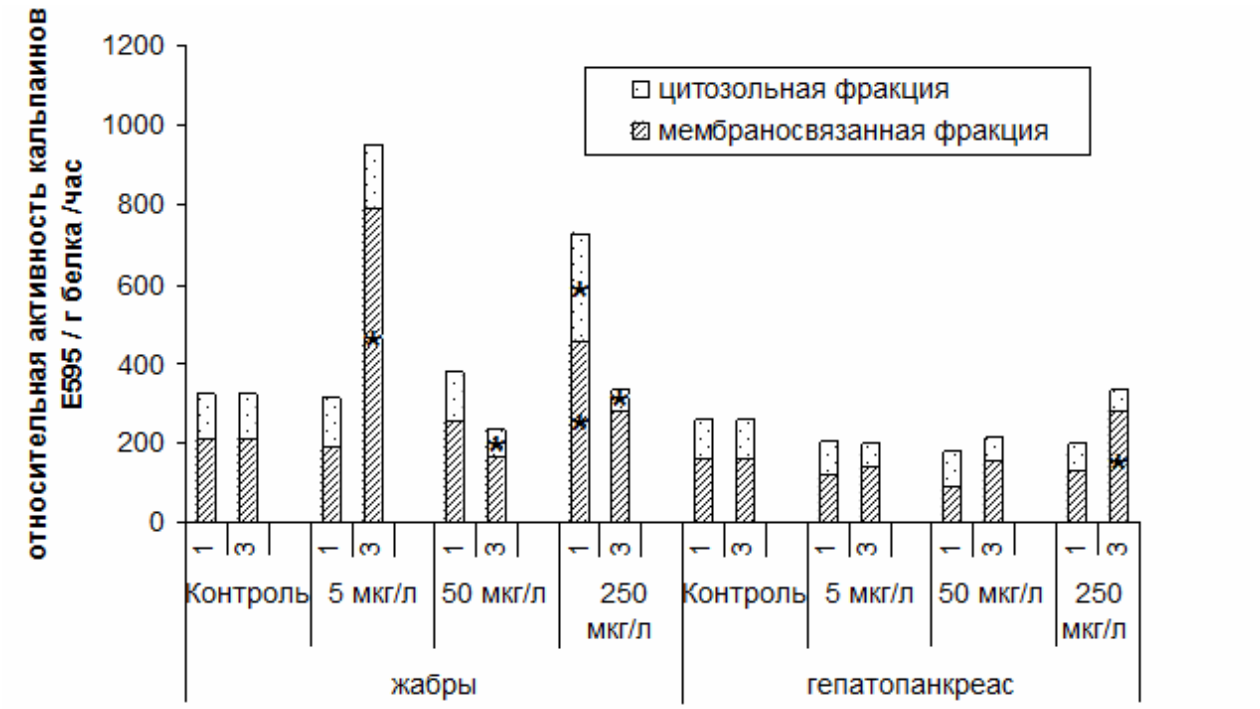


*Рис. 2.* Относительная активность кальпаинов ($E_{595}$/г белка/час) в органах мидии *Mytilus edulis* L. при действии различных концентраций меди (1 – 1 сутки экспозиции, 3 – 3 сутки экспозиции, * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$)

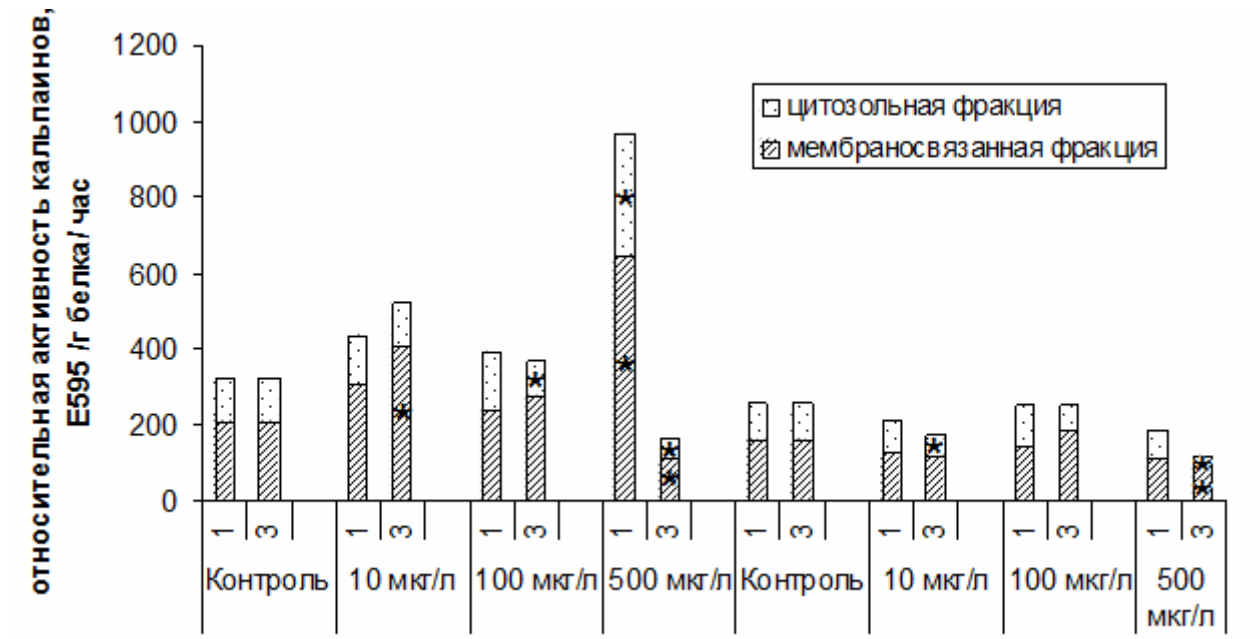


*Рис. 3.* Относительная активность кальпаинов ($E_{595}$/г белка/час) в органах мидии *Mytilus edulis* L. при действии различных концентраций кадмия (1 – 1 сутки экспозиции, 3 – 3 сутки экспозиции, * – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$)

Наряду с этим было установлено, что в гепатопанкреасе мидий уровень активности кальпаинов не изменялся при суточном воздействии меди и кадмия всех изученных концентраций; лишь через трое суток наблюдались достоверные отличия $Ca^{2+}$-зависимой активности в данном органе. Вероятно, это можно объяснить тем, что к этому времени может начинаться отток металлов от уязвимых тканей (жабры) к тканям, функционально задействованным в детоксикации, аккумуляции и экскреции ксенобиотиков (гепатопанкреас и почки).

Обращает на себя внимание то, что кадмий и медь при трехсуточной экспозиции оказывают противоположное действие на активность кальпаинов в гепатопанкреасе. Подавление активности кальпаинов при действии кадмия, вероятно, можно объяснить его способностью ингибировать биомолекулы за счет специфичного связывания с их реакционными SH-группам. Следовательно, можно предположить, что при такой длительности воздействия аккумулированный из среды металл не только проник во внутреннюю среду организма, но и достиг субклеточных структур. Что касается меди, то известна важная роль этого металла в процессах дыхания беспозвоночных как компонента дыхательного пигмента крови – гемоцианина, при этом медь является вторым по степени накопления тяжелым металлом в жабрах (Андроников и др., 2002). Можно предположить, что при перераспределении в организме меди, поступившей из среды, большая ее часть задерживается в жабрах, а в гепатопанкреас поступает незначительная доза, способная индуцировать репаративные и экскреторные процессы, о чем можно судить по наблюдаемой активации кальпаинов после трехсуточного воздействии меди в самой высокой из изученных концентраций (250 мкг/л).

## Заключение

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было протестировано действие катионов двух- и трехвалентных металлов на активность протеиназ семейства кальпаинов из тканей мидий. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизм специфичного взаимодействия тяжелых металлов с изучаемыми цистеиновыми протеиназами может реализовываться как за счет блокирования SH-групп их активного центра, так и за счет замещения их активатора (кальция) на кальций-зависимых этапах функционирования кальпаинов. Обнаружено инактивирующее действие катионов кадмия, кобальта, цинка и железа (III) на частично очищенный кальпаин мидий, однако, некоторые металлы (барий), аналогично кальцию, способны активировать кальпаины.

Установлено, что при опосредованном влиянии ионов меди и кадмия, растворенных в среде, на кальпаины в органах мидий, их активность зависит от концентрации металла, времени воздействия и природы действующего металла, определяющей специфичность его действия, динамику аккумуляции и перераспределения в организме.

*Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-01140-а, Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-306.2008.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».*

## Литература

Андроников В. Б., Коротнева Н. В., Пашкова И. М., 2002. Содержание тяжелых металлов в различных тканях кальмара *Illex illecebrosus* // Экологическая химия. № 11(1). С. 40–44.

Губанов В. И., Болтачев А. Р., Копытов Ю. П., 2008. Состояние загрязнения донных отложений Феодосийского залива нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами // Экология моря. Вып. 75. С. 89–93.

Гублер Е. В., Генкин А. А., 1969 Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 125 с.

Челомин В. П., Бельчева Н. Н., Захарцев М. В., 1998. Биохимические адаптации мидии *Mytilus trossulus* к ионам кадмия и меди // Биология моря. Т. 24. № 5. С. 319–325.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. № 72. P. 248–254.

Enns D. L., Belcastro A. N., 2006. Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting // Can. J. Physiol. Pharmacol. № 84. P. 601–609.

Gaitanaki C., Papazafiri P., Beis I., 2003. The calpain-calpastatin system and the calcium paradox in the isolated perfused pigeon heart // Cell Physiol Biochem. №. 13(3). P. 173–180.

Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noel J., Fleurence J., 2000. Milli-calpain from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation in vitro // Comp. Biochem. Physiol. Vol. 125. № 1. P. 83–95.

Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y., Tanaka K., 1981. A quantitative distribution study on calpain and calpastatin in rat tissues and cells // Biochem. Int. Vol. 2 (6). P. 651–656.

Fung C. N., Lam J. C. W., Zheng G. J., Connell D. W., Monirith I., Tanabe S., Richardson B. J., Lam P. K. S., 2004. Mussel-based monitoring of trace metal and organic contaminants along the east coast of China using *Perna viridis* and *Mytilus edulis* // Environ. Poll. Vol. 127. P. 203–216.

## THE EFFECT OF HEAVY METAL IONS ON INTRACELLULAR $Ca2^+$-DEPENDENT PROTEINASES IN *MYTILUS EDULIS* L. IN THE EXPERIMENTS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

**N. P. Kantserova, L. A. Lysenko, N. N. Nemova, V. V. Ostashkova**
[1] Institute of Biology Karelian Research Centre RAS, Petrozavodsk, Russia
[2] Petrozavodsk State University, Petrozavodsk
e-mail: nkantserova@yandex.ru

The effect of heavy metal ions on intracellular $Ca2^+$-dependent proteinases (calpains) of mussels, *Mytilus edulis* L., has been investigated *in vitro* and *in vivo*. Mechanism of action of heavy metal ions with calpain can be realized by binding with SH-group of the enzyme or by replacement of $Ca2^+$ in $Ca2^+$-dependent processes. Some heavy metal ions ($Cd2^+$, $Co2^+$, $Zn2^+$, $Fe3^+$) has been found to be ineffective for the activation of mussel calpain *in vitro,* while $Ba2^+$ has been found to be able to activate the enzyme. In aquaria experiment was shown that the effect of $Cu2^+$ and $Cd2^+$ on calpain activity depends on concentration of ion, time of action and metal properties defining its specificity and the accumulation and redistribution dynamics in the organs.

## ТЕРМОПРЕФЕРЕНДУМ МОЛОДИ КАРПОВЫХ И ОКУНЕВЫХ ВИДОВ РЫБ ВЕРХНЕЙ ВОЛГИ

**Д.С. Капшай[1], В.К. Голованов[2]**
[1] Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, г. Ярославль, Россия
[2] Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл.
e-mail: kapsh@ibiw.yaroslavl.ru, golovan@ibiw.yaroslavl.ru

В процессе прохождения сезонных жизненных циклов рыбы используют различные формы температурных адаптаций, такие как температурная акклимация, терморегуляционное поведение, адаптации к предельно высоким и низким температурам, а также « зимнюю спячку» (Голованов и др., 1997). Терморегуляционное поведение представляет собой широко распространенную форму температурной адаптации и заключается в самопроизвольном выборе, возможно, наиболее оптимальных условий окружающей водной среды в зависимости от сезона года, времени суток, возраста животных и их физиолого-биохимического статуса. В результате многочисленных наблюдений в естественных условиях, а также в ходе лабораторных экспериментов само явление выбора новых температурных зон, отличных от температуры предварительной акклимации, получило название термопреферендума. Процесс выбора имеет фазный характер (Голованов, 1996; Лапкин и др., 1981; Свирский, 1996; Golovanov, 2006; Reynolds, Casterlin, 1979). Вначале (минуты, часы, сутки) происходит перемещение животных из исходных температурных условий в более высокие или низкие (в зависимости от того, на каком уровне температурного диапазона жизнедеятельности находились особи). Затем, достаточно часто с явлением «овершута» вверх или вниз, рыбы достигают области так называемого конечного термопреферендума или конечных избираемых температур. После этого избираемые температуры стабилизируются, иногда возникают периодические колебания избираемых уровней выше или ниже оптимальных. Меняющиеся условия среды (отсутствие корма, присутствие хищников, различного рода инфекции и др.) приводят к изменению уровня конечного термопреферендума.

Непосредственно зона конечных избираемых температур достаточно часто совпадает с областью эколого-физиологического оптимума, отражая тем самым оптимальные условия развития, роста, питания и поведения молоди и взрослых рыб (Golovanov, 2006; Jobling, 1981). С учетом существующих и развивающихся представлений об оптимальности (Вербицкий, 2008; Зданович, 2001; Константинов и др., 1991; Golovanov, 2006) эколого-физиологический оптимум не выглядит чем-то жестким и консервативным, расположенным только в одном месте на температурной шкале жизнедеятельности. Это подтверждают и многочисленные исследования суточных вертикальных миграций рыб. В ходе их было установлено, что отдельные группировки одного и того же вида могут совершать миграции в толще воды в широком диапазоне температур как ниже, так и выше оптималь-