

Возможными механизмами, вызывающими суточные вертикальные миграции копепод, могут быть, с одной стороны, преимущественная фитофагия большинства из них (Перуева, 1984; Martynova et al., unpublished) и, таким образом, стремление к верхним, наиболее богатым фитопланктоном слоям воды. С другой стороны, стремление избежать как поимки их зрительными планктонофагами (Виноградов, 1968), так и окислительного стресса (Martynova, Gordeeva, in press) заставляет рачков мигрировать в светлое время суток в глубокие слои воды.

Литература

- Виноградов М. Е., 1968. Вертикальное распределение океанического зоопланктона М.: Наука. М. 319 с.
- Перуева Е. Г., 1984. Сравнительная оценка питания двух массовых копепод Белого моря // Океанология. Т. 24. С. 813–818.
- Перцова Н. М., 1970. Зоопланктон Канда拉克шского залива Белого моря // Тр. ББС МГУ. Т. 3. С. 34–45.
- Перцова Н. М., 1971. О количественном вертикальном распределении зоопланктона в Канда拉克шском заливе Белого моря // Комплексные исследования природы океана. Изд. МГУ. Вып. 2. С. 152–162.
- Прыгункова Р. В., 1977. Зоопланктон Канда拉克шского залива в сравнении с зоопланктоном на декадной станции Д-1 в губе Чупа (Белое море) // Экология морского планктона. Исслед. фауны морей. Х1Х(ХХУП). Л.: Зоологический институт. С.100–108.
- Руководство методам биологического анализа морской воды и донных отложений, 1980. / Ред. А.В. Цыбань Л.: Гидрометеиздат. 191 с.
- Эпштейн Л. М., 1957. Зоопланктон Онежского залива и его значение в питании сельди и молоди рыб // Материалы по комплексному изучению Белого моря. Т. 1. Изд. АН СССР. М.-Л. С. 315–349.
- Эпштейн Л. М., 1963. Зоопланктон Белого моря и его значение в питании сельди // Проблемы использования промысловых ресурсов Белого моря и внутренних водоемов Карелии. Вып. 1. Изд. АН СССР, М.-Л. С. 98–104.
- Martynova D. M., Gordeeva A. V. Light-dependent behaviour of major zooplankton species in the White Sea with some implications to their feeding and life cycle patterns, Journal of Plankton Research, in revision.

ВЛИЯНИЕ АККУМУЛЯЦИИ РТУТИ НА АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ В ТКАНЯХ ОКУНЕЙ (*PERCA FLUVIATILIS*) ИЗ ОЗЕР ВБЛИЗИ БИОСТАНЦИИ КАРТЕШ (БЕЛОЕ МОРЕ)

Е.И. Кяйвяряйнен¹, Е.В. Борвинская¹, Н.Н. Немова¹, В.Т. Комов²

¹Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия

²Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: hela_kaiv@mail.ru

В последнее время в связи с возрастающим антропогенным воздействием на окружающую среду значительно возросло внимание к проблеме существования и выживания организмов под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды. Среди неблагоприятных воздействий можно выделить увеличение концентрации токсических агентов, в особенности тяжелых металлов. Попадая в организм они оказывают негативное влияние на все уровни организации, включая субклеточный. Действие на организм токсических и экологических факторов внешней среды сопровождается вовлечением клеточных и молекулярных механизмов регуляции гомеостаза. Среди множества механизмов регуляции внутриклеточного метаболизма важное место занимает протеолиз, т.к. протеолитические ферменты действуют на первом, ключевом этапе метаболизма белковых резервов клетки (Немова, 1996).

Особое место среди тяжелых металлов занимает ртуть, обладающая уникальными экогеохимическими и экотоксикологическими свойствами, обусловленными ее вездесущностью, разнообразием форм существования, повышенной возможностью распределения и биопереноса в окружающей среде, а также широким и разносторонним спектром негативных воздействий на организмы и их популяции (Немова, 2005).

Известно, что ртуть накапливается в водоемах, и в условиях закисления, органической и микробной загрязненности, повышенной цветности воды, связывается с фульвокислотами, образуя опасные ртутьорганические комплексы метилртути (Комов, 1999). Основным путем поступления ртути в организм является её потребление с пищей. С этим связано бионакопление метилртути по водным пищевым

цепям. Метилртуть, накапливаясь в обитающих в воде организмах – растениях, бентосе, животных, концентрируется в верхних трофических звеньях пищевой цепи – рыбе. Так, водные беспозвоночные в основном из-за своего малого размера, короткого жизненного периода и кормления на низком трофическом уровне аккумулируют более низкие концентрации метилртути, чем рыба. Употребление рыбы с большим содержанием метилртути опасно для здоровья. Уровень предельно допустимых значений содержания ртути в мышцах рыб пресноводных водоемов, согласно данным санитарно-гигиенических нормативов РФ по содержанию ртути в различных средах, составляет 0,3 мг/кг.

Метилртуть является более жирорастворимой по сравнению с неорганической формой. Это обеспечивает проникновение MeHg через клеточные мембраны и поражение органов и тканей организма, что ведет к изменению белкового и липидного обмена (Голованова, Комов, 2005). В клетке преимущественным местом аккумуляции ртути является цитозоль, умеренные количества ртути обнаружены в ядерной, митохондриальной и микросомальной фракциях, а в лизосомах не выявлено сколько-нибудь значимое ее накопление (Bose et al., 1993). Ртуть неблагоприятно влияет на целый ряд клеточных функций, включая регулирующие уровень свободного Ca^{2+} в цитозоле. Увеличение содержания кальция за счет его высвобождения из внутриклеточных депо происходит сопряженно с накоплением ртути в цитозоле. (Nathanson et al., 1995).

Инструментом клеточно-молекулярных приспособлений служат ферменты, главными функциями которых в клетке являются катализ биохимических реакций и регуляция обмена веществ. Ключевую роль в поддержании метаболического гомеостаза играет протеолитическая ферментная система. Именно с этим связан отрицательный эффект, оказываемый токсикантами на молекулярном уровне. Он заключается в индукции или ингибировании ферментов и ферментных систем и связанных с ними функций.

Кальций-активируемые протеиназы цитозоля (кальпаины) относятся к группе цистеиновых (тиоловых) протеиназ и показывают большую чувствительность к воздействию ртути, поэтому могут служить в качестве биоиндикаторов ртутного воздействия на организм (Немова, 2005). Ca^{2+} -активируемые протеиназы являются показателями воздействия ртути по нескольким причинам:

- представляют собой биолиганды для связывания ртути, т.к. содержат структурные и функциональные SH-группы;

- локализованы в цитозоле, преимущественном месте депонирования ртути в клетке;

- проявляют активность, абсолютно зависимую от наличия Ca^{2+} , концентрация которого меняется от ртутной нагрузки;

- в процессе блокирования ионами ртути тиоловые группы цистеин-зависимых протеиназ теряют свои реакционные свойства, что, в свою очередь, угнетает целый ряд метаболических путей, таких как каскадные процессы образования комплемента, фибринолизиса и др. (Антонов, 1983). Ингибирование цистеинзависимых ферментов снижает скорость белкового обмена и реакций, регулируемых этими ферментами.

Два вида Ca^{2+} -зависимых нейтральных протеиназ, активируемых микромолярными (40–100 мкМ) и миллимолярными (1–5 мМ) концентрациями Ca^{2+} , – кальпаин I и кальпаин II, могут присутствовать в ткани одновременно, хотя их соотношение может быть различным (Suzuki et al., 1988). Присоединение Ca^{2+} приводит к диссоциации молекулы фермента на субъединицы: большую каталитическую 80 кДа и малую регуляторную 30 кДа. Субъединица 80 кДа полностью ферментативно активна.

Объектом исследований был выбран речной окунь *Perca fluviatilis* L. Взрослый окунь является хищником, и в малых озерах Карелии часто занимает положение на вершине водной трофической цепи, накапливая большие концентрации ртути, что может угрожать здоровью человека при потреблении этой рыбы в пищу. Окунь был выловлен из озер Карелии Среднее, Жемчужное, Круглое и Кривое, расположенных вблизи ББС «Картеш» (Белое море). Содержание ртути в биологическом материале определяли с помощью метода атомной абсорбции (Назаренко и др. 1986) в Институте БВВ РАН. По имеющимся данным накопление ртути в мышцах максимально у окуней из озера Жемчужное и превышает ПДК, минимально для окуней из озера Кривое. Уровень ртути ниже нормативов в озерах Кривое, Круглое, Среднее (таб. 1).

Пробы мышц окуней (самки) из озера Круглое выделены в 2 группы с минимальным (min) и максимальным (max) содержанием ртути.

Таблица 1

Среднее содержание ртути в мышцах окуней из исследованных озер

Озеро	Концентрация ртути в мышцах рыб, мг/кг сырой массы
Круглое ♀	0,12 – min- 0,19 – max)
Кривое ♂	0,09
Жемчужное	0,36 – ♀ 0,38 – ♂
Среднее	0,14 – ♀ 0,15 – ♂

Данные, характеризующие такие свойства озер как кислотность и содержание органического углерода получены для озер Кривое и Круглое (таб. 2).

Таблица 2.

Характеристика озер Круглое и Кривое

Озеро	Площадь, га	Глубина, м	Содержание органического углерода, мг/л	pH
Круглое	19,0	3,5–4	22,6	5,9–6,7
Кривое	9,98	–	6,4	4,3–4,7

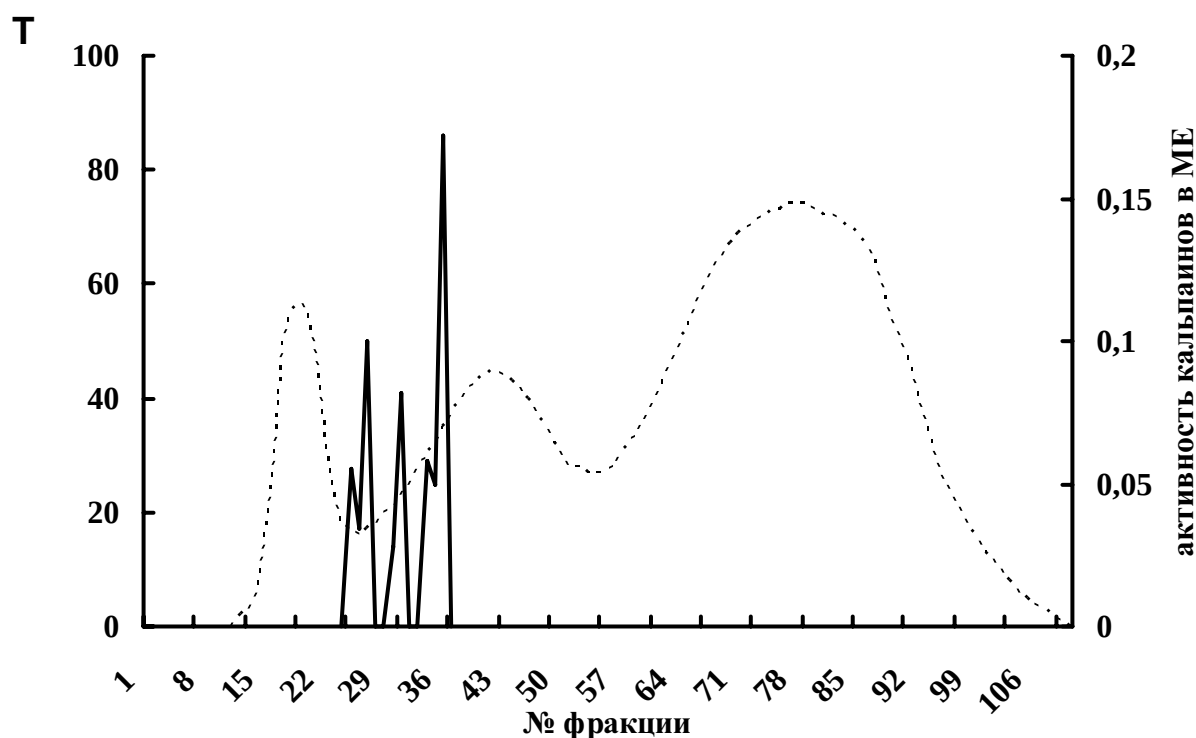


Рис. 1. Профиль распределение водорастворимых белков (-----) Ca^{2+} -активируемой активности (—) в мышцах самок окуня (*Perca fluviatilis*) из оз. Среднее. T_{280} – поглощение белка, МЕ – международные единицы активности фермента

Профили элюции водорастворимых белков в различных тканях окуня после гель-хроматографии на Sephacryl SH-300 соответствуют распределению белков по молекулярным массам (рис.1). Элюируемые с колонки белки делятся на три пика: первыми с колонки выходят высокомолекулярные белки (Мг 400–110 кДа), затем белки с Мг в пределах 110–60 кДа, последними – низкомолекулярные вещества белковой природы, пептиды. Протеолитическая активность, инициируемая ионами кальция, согласно методу (Yoshimura

N. et al., 1983), обнаруживается в трех фракциях белкового элюента и определяется как сумма трех пиков активностей (рис.1) в МЕ единицах, соответствующих $E_{280}/г$ ткани за 30 мин реакции при $30^{\circ}C$.

Активность кальций-активируемых протеиназ исследовалась в образцах мышечной ткани как в месте максимального накопления ртути (Немова и др., 2001). В экспериментах сравнивали уровень активности кальпаинов в группах рыб аналогичного пола и возраста, так как показана зависимость активности протеиназ от этих показателей (Немова, 2005).

Полученные в ходе эксперимента результаты по определению уровня активности кальций-зависимых протеиназ (КІ, КІІ и субъединицы) в мышцах окуней, выловленных из всех исследуемых озер, представлены на рис. 2, а также для окуней (самки) из озера Кривое получены данные для различных тканей (жабры, мышцы, печень и гонады) (рис. 3).

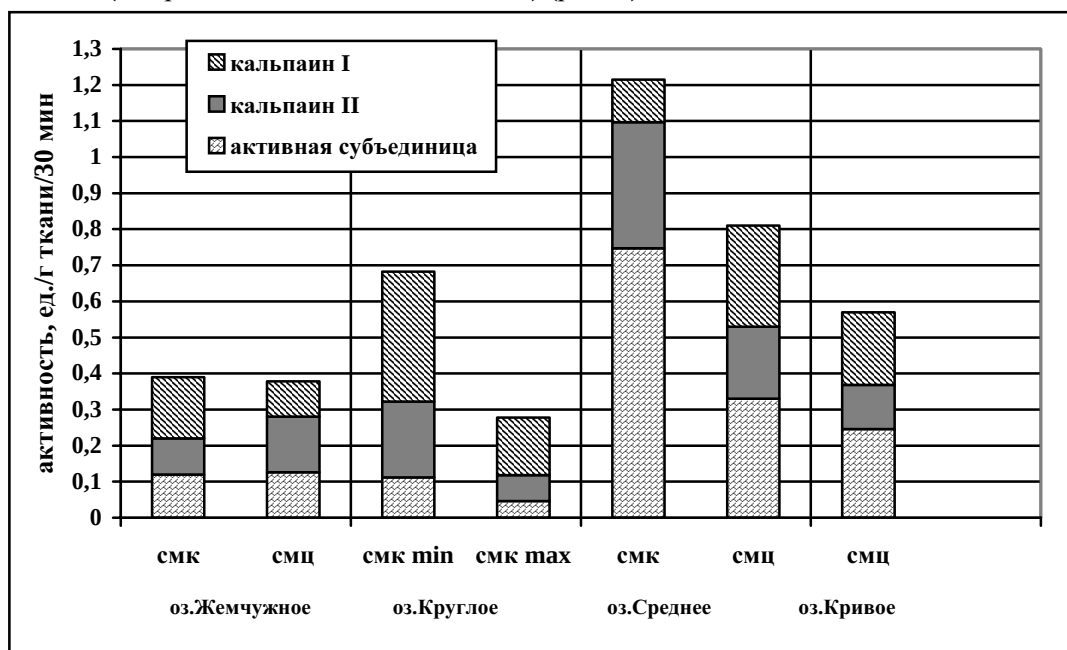


Рис. 2. Уровень Ca^{2+} -зависимой активности в мышцах окуней (*Perca fluviatilis*) с различным содержанием ртути

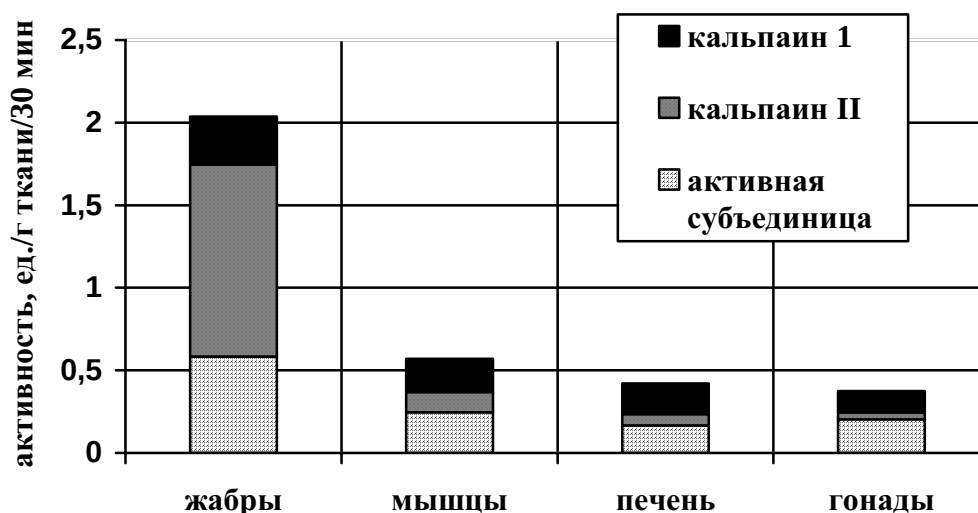


Рис. 3. Уровень Ca^{2+} -зависимой активности в гонадах, жабрах, печени и мышцах окуня (*Perca fluviatilis*) в расчете на г ткани из озера Кривое

Как следует из экспериментальных данных (рис. 2) по мышцам окуней из различных озер, Ca^{2+} -зависимая суммарная активность (кальпаинов I, II и субъединиц) в мышцах окуней из озера Жемчужное, с максимальным содержанием ртути в мышцах, ниже, чем в других образцах. При воз-

растании концентрации ртути в мышечной ткани окуней (самки) из озера Круглое активность цистеин-зависимых протеолитических ферментов уменьшается. Для озера Жемчужное, в котором концентрация ртути в мышцах окуня больше почти в три раза по сравнению с другими озерами, характерна такая же зависимость. Из этого можно сделать вывод об угнетающем эффекте накопления ртути в мышцах окуней на активность фермента. Максимальная суммарная активность кальпаинов характерна для окуней из озер Среднее и Круглое, со средним относительно других озер содержанием ртути в мышцах. Кроме того, отмечено существенное увеличение всех показателей активности кальпаинов у окуней из озера Среднее.

Что касается субъединичной активности, то она максимальна в мышцах самок окуней из озера Среднее, и минимальна в мышцах самок из озера Круглое. Оба озера характеризуются средним содержанием ртути. Для всех проб характерно доминирование субъединичной активности, за исключением озера Круглое, где преобладает активность кальпаина I. Активность субъединицы свидетельствует о неустойчивости фермента в данных условиях.

Второе место по уровню активности, в основном, занимает кальпаин I, хотя его активность меньше там, где преобладает субъединичная активность. Активация кальпаина II косвенно указывает на развитие приспособительных реакций Ca^{2+} -зависимого протеолиза в клетке и на развитие патологического процесса. Соотношение активности кальпаина I и кальпаина II при изменении содержания ртути в мышцах меняется.

Сравнивая уровень активности кальпаинов в мышцах у самок и самцов окуней из озер Жемчужное и Среднее, выявили, что суммарная активность фермента выше у самок по сравнению с самцами при почти одинаковом содержании ртути в мышцах. Таким образом, обнаружены различия в активности ферментов Ca^{2+} -активируемого протеолиза в зависимости от пола. Это хорошо видно в озере Среднее, особенно по уровню субъединичной активности. У самок активность кальпаинов выше, что, возможно, связано с большей активностью адаптативных реакций. Это указывает на наличие половых различий в механизмах адаптации, запускаемых в ответ на действие неблагоприятных факторов.

Суммарная активность Ca^{2+} -активируемых протеиназ в жабрах исследуемых рыб из озера Кривое выше во много раз по сравнению с другими органами (рис. 3). Это связано с тем, что жабры выполняют барьерную функцию и в первую очередь поражаются присутствующими в воде повреждающими агентами. Это вызывает активацию субклеточных адаптативных механизмов, в особенности ферментов протеолиза, в том числе цистеинзависимых протеиназ цитозоля. Существенно меньшую активность Ca^{2+} -зависимые протеиназы проявляют в мышцах. Сходный уровень активности в ходе опыта выявлен в тканях печени, для которой характерна фильтрация вредных веществ из крови и связанные с этим активные процессы детоксикации. Минимальная активность кальпаинов определена в гонадах, которая зависит от стадии зрелости (Немова, 1996). Таким образом, показана тканеспецифичность уровня активности Ca^{2+} -активируемых протеиназ у исследуемых окуней. Максимальная активность фермента обнаружена в жабрах, затем в мышцах, печени и гонадах.

Обнаружено влияние аккумуляции ртути в мышцах окуней на активность кальпаинов. Цистеин-зависимые ферменты являются мишенью для токсического действия ртути, ионы которой взаимодействуют с тиоловыми группами их активных центров, тем самым лишая их каталитической активности. Даже незначительные концентрации обладают ингибирующим действием на метаболизм клетки и, соответственно, на активность Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы. Повреждающее действие соединений ртути на молекулярном уровне проявляется в ингибировании ферментов, необратимых конформационных изменениях белковых макромолекул и, как следствие, изменение скорости процессов метаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-306.2008.4; гранта РФФИ 08-04-01140, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России».

Литература

- Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Мир, 1983. 367 с.
Голованова И.Л., Комов В.Т. Пищеварительные карбогидразы плотвы при различном накоплении ртути в организме. Тез.докл.IV Междун.конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Севера» Вологда. 2005. Ч.I. С. 103–105.

Комов В.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер Северо-Запада России: Причин, последствия, прогноз: Автореф. дис. ... докт.биол.наук. СПб., 1999. 45 с.

Назаренко И.И., Кислосева И.В., Кашина Л.И и др. Атомно-адсорбционное определение ртути в водах после сорбционного концентрирования на полимерном тиоэфире // Журн.аналит.химии. 1986. Т. 11, № 8. С. 1385–1390.

Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1996. 216 с.

Немова Н.Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М: Наука, 2005. 161 с.

Немова Н.Н., Кийвярайнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А. Активность внутриклеточных протеолитических ферментов в тканях окуня *Perca fluviatilis* с различным содержанием ртути // Вопр.ихтиол. 2001. Т. 41. № 5. С.704–707.

Bose S., Ghosh P., Bhattacharya S. Distribution kinetics of inorganic mercury in the subcellular fractions of fish liver // Sci.Total Environ. 1993. Supplement, pt.1. P.533–538.

Nathanson M.H., Mariwalla K., Ballatori N., Boyer J.L. Effects of Hg^{2+} on cytosolic Ca^{2+} in isolated skate hepatocytes // Cell.Calcium. 1995. Vol.18, N5. P.429–439.

Suzuki K., Imajoh S., Emori Y. et al. Regulation of activity of calpain // Adv/Enzymol.Regulat/ 1988. Vol. 27. P. 153–162.

Yoshimura N., Kikuchi T., Sasaki T., Kitahara A., Hatanaka M., Murachi T. Two distinct Ca-proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney. J.Biol.Chem. 1983. Vol.258. P. 8883–8889.

EFFECT OF ACCUMULATION OF MERCURY ON ACTIVITY Ca^{2+} -ACTIVATED PROTEINASES IN TISSUES OF PERCHES (*PERCA FLUVIATILIS* L.) FROM LAKES NEAR BIOLOGICAL RESEARCH STATION KARTESH (WHITE SEA).

¹Kaivarainen E., ¹Borvinskaya E., ¹Nemova N., ²Komov V.

¹Institute of Biology KRC RAS Petrozavodsk E-mail: hela_kaiv@mail.ru

²Institute of Internal Water Biology RAS

^Influence of accumulation of mercury in muscles of perches from lakes near White sea on activity of cysteine Ca-dependent proteinases is revealed. It is connected with inhibition of cysteine enzymes as a result of interaction mercury with thiol groups of their active centers.

ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА НА ПРИМЕРЕ ЦИТОХРОМА В АЛТАЙСКИХ ОСМАНОВ (*OREOLEUCISCUS WARPACHOWSKI*) МОНГОЛИИ

Е.И. Лаврова, Ю.В. Слынько

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: lavr@ibiw.yaroslavl.ru

Алтайские османы, принадлежащие к роду *Oreoleuciscus* Warp., представляют своеобразную группу карповых рыб. Они являются характерными обитателями внутренних водоемов северо-западной Монголии, бессточных озер Монгольского Гоби и юго-восточного Алтая.

Попытки характеристики различных видов этого рода показали, что морфологические признаки османа довольно изменчивы не только у рыб из различных водоемов, но даже и у особей из одного и того же водоема. Затрудняет решение вопроса также наличие в некоторых водоемах крупных и мелких форм, представленных половозрелыми особями резко различного размера.

В последнее время для решения подобных таксономических проблем, а также для выяснения родственных связей и эволюции таксонов в различных группах организмов (как животных, так и растительных) широко применяются молекулярно-генетические методы исследований.

В этой связи нами предпринята попытка найти универсальный метод идентификации рыб, относящихся к данному роду, обитающих в различных регионах Монголии. В данной работе приведены первые, предварительные результаты исследований митохондриальной ДНК (мтДНК) монгольских османов.