

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ МЕДИ И КАДМИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L.

М. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова, В. С. Скидченко

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

Тяжелые металлы – одни из основных поллютантов, поступающих в морскую среду, главным образом, с атмосферными осадками и в процессе таяния снега. 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. Мидии *Mytilus edulis* – один из важнейших представителей марикультуры Белого моря, которые являются в то же время удобным объектом для исследований, так как ведут неподвижный образ жизни и являются, как известно, биофильтрами моря. Успехи, достигнутые в исследованиях протеиназ (Мосолов, 1988; Немова, 1996, Немова, 2005), практически не коснулись морских беспозвоночных. Вместе с тем, моллюски, ракообразные и иглокожие относятся к наиболее древним, многочисленным в видовом отношении и разнообразным по экологии классам животных. Системное исследование протеолитических ферментов у этих беспозвоночных позволит изучить их функциональную роль в жизнедеятельности, даст возможность оценить процесс протеолиза под влиянием различных биотических и абиотических воздействий. Известно, что реализация защитной функции лизосом при воздействии на организм внутренних и внешних факторов осуществляется при участии лизосомальных гидролаз, в том числе протеолитических (катепсинов) (Дин, 1981). Стабильность лизосомальных мембран, как и активность ферментного комплекса, может в значительных пределах меняться при различных патологических состояниях организма. Например, при гипоксии, изменении кислотно-щелочного равновесия, воздействии тяжелых металлов и др. (Немова, Сидоров, 1980; Немова, 1996; Moore, 1985; Nemova et al., 2004).

В настоящей работе изучали изменение активности основных лизосомальных протеиназ животных тканей – катепсинов В (тиолзависимой приетиныазы) и D (карбоксилзависимой протеиназы) в жабрах и гепатопанкреасе мидий *Mytilus edulis* L. при воздействии солей меди и кадмия в эксперименте *in vitro*. В условиях аквариального эксперимента моллюски подвергались воздействию кадмия, неэссенциального металла, способного связываться с SH-группами биомолекул, и меди – эссенциального металла, в высоких концентрациях токсичного для организма.

Аквариальный эксперимент был выполнен на одноразмерных мидиях, отловленных на сублиторали в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря. После акклимации к лабораторным условиям мидии были разделены на 7 групп и помещены в аквариумы, содержащие растворы солей (хлоридов) меди и кадмия (концентрация приведена в пересчете на катион): группа 1–5 мкг/л Cu^{2+} , группа 2–50 мкг/л Cu^{2+} , группа 3 – 250 мкг/л Cu^{2+} , группа 4 – 10 мкг/л Cd^{2+} , группа 5 – 100 мкг/л Cd^{2+} , группа 6–500 мкг/л Cd^{2+} . Контролем служили моллюски, содержащиеся в аквариуме без добавления металлов (группа 7). Время экспозиции составляло одни и трое суток, а затем из каждой группы отбирали для дальнейшего изучения по 7 особей. До начала эксперимента жабры и гепатопанкреас замораживали и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Активность лизосомальных протеиназ, катепсинов В и D, определяли спектрофотометрически (Алексеев, 1968) по гидролизу белковых и пептидных субстратов. Активность ферментов выражали в единицах поглощения при 280 нм (катепсин D) и 525 нм (катепсин В) на мг белка. Концентрацию тканевых белков определяли методом Брэдфорд, (Bradford, 1976).

На основании полученных данных по изменению содержания белка и активности катеп-

синов в тканях мидий при воздействии исследуемых металлов, можно сделать следующие выводы.

Возрастает удельная активность катепсина В в гепатопанкреасе мидий, помещенных в аквариумы с различным разведением меди при разведении 5 мкг/л, затем уровень активности фер-

мента снижается при 50 мкг/л и вновь повышается (особенно в 1 сутки эксперимента) при максимальной концентрации металла – 250 мкг/л. В жабрах активность катепсина В снижается при разведении 5,50 мкг/л и резко возрастает при максимальных (250 мкг/л) концентрациях меди (рис. 1).

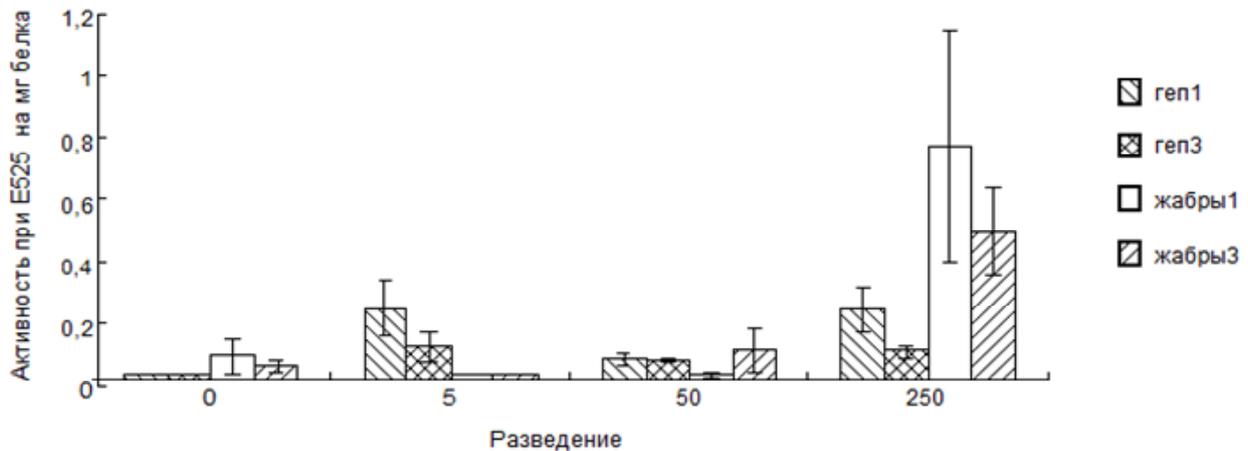


Рис. 1. Влияние аккумуляции меди (концентрация 5, 50, 250) мг на активность катепсина В в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₅₂₅ на мг белка

Активность катепсина D в изученных органах мидий повышается как при экспозиции в 1, так и в 3 суток. Исключением являются жабры, в которых в первые сутки при разведении металла до 5 мкг/л активность возрастает в 5 раз и

резко снижается через 3 суток. При максимальном разведении соли меди (250 мкг/л) активность данного фермента превышает уровень контрольных значений в 2–3 раза как в гепатопанкреасе, так и в жабрах мидий (рис. 2).

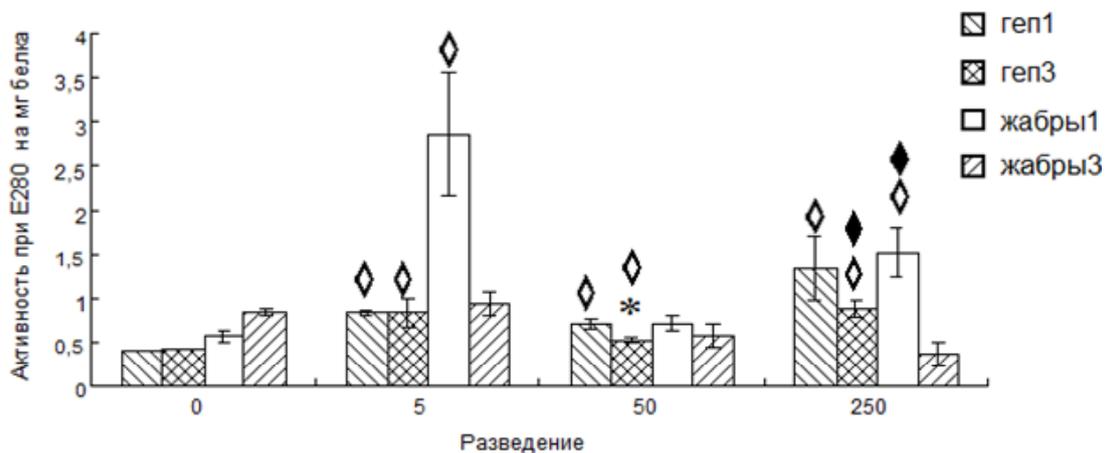


Рис. 2. Влияние аккумуляции меди (концентрация 5, 50, 250) мг на активность катепсина D в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₂₈₀ на мг белка

Условные обозначения: * – различия между временем инкубации достоверны; \diamond – различия достоверны при сравнении с контролем; \blacklozenge – различия достоверны между разведением ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни)

Активность цистеинзависимой (или тиоловой) протеиназы лизосом – катепсина В в гепатопанкреасе и жабрах мидий, помещенных в ак-

вариумы с разбавлением солей кадмия, значительно снижена по сравнению с контролем и с аналогичным экспериментом с использованием

солей меди. Наиболее выраженные изменения уровня активности данного фермента обнаружены в гомогенатах жабр у мидий в аквариумах с разведением 10, 100 мкг/л (экспозиция 3 суток)

и наблюдается особенно резкое падение активности катепсина В в жабрах мидий в аквариумах с максимальным разведением соли кадмия (рис. 3).

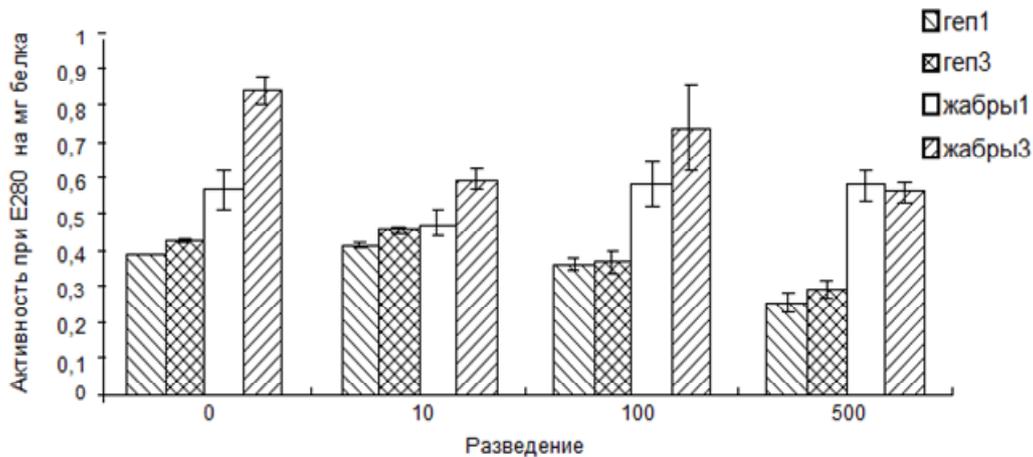


Рис. 3. Влияние аккумуляции кадмия (концентрация 10, 100, 500) мг на активность катепсина В в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₅₂₅ на мг белка

Активность катепсина D в гепатопанкреасе мидий почти не зависит от времени экспозиции с кадмием и несколько снижается при концентрации металла 500 мг/л. В жабрах мидий ак-

тивность фермента немного выше при 3-суточной экспозиции при концентрациях металла до 10 и 100 мг/л и эти различия исчезают при концентрации кадмия 500 мг/л (рис. 4).

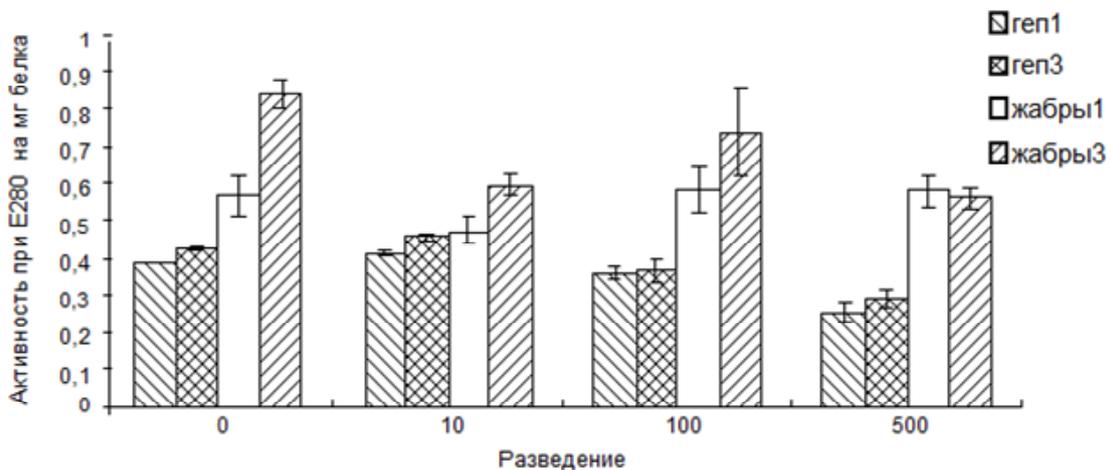


Рис. 4. Влияние аккумуляции кадмия (концентрация 10, 100, 500) мг на активность катепсина D в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₂₈₀ на мг белка

Ингибирование цистеинзависимых ферментов не только снижает скорость белкового обмена и реакций, регулируемых этими ферментами, но и подавляет защитную роль лизосом, так как уже указывалось, что ферменты лизосом принимают участие в процессах экскреции и детоксикации низких доз катионов тяжёлых металлов (Чекунова, Фролова, 1986).

Активность лизосомальной аспартильной протеиназы катепсина D прямо не зависит от ковалентного связывания реакционных групп активного центра с металлами, его реактивность в этих условиях может быть связана с участием фермента в детоксикации и иммунных процессах в лизосомах.

Таким образом, было установлено, что активность лизосомальных протеиназ изменяется в

зависимости от типа действующего металла, его концентрации и времени воздействия. По совокупности наблюдений, очевидно, что присутствие меди стимулирует компенсаторные изменения, в то время как кадмий угнетающе действует на кальций-зависимый протеолиз.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Программы Президента «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4, РФФИ № 08-04-01140-а, Программы Президиума РАН «Биоразнообразие 2009–2011 гг.».

Литература

Алексеев Л. П. Определение активности протеолитических ферментов / Л. П. Алексеев // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1968. – С. 115–130

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.

Мосолов В. В. Механизмы контроля протеолиза / В. В. Мосолов // Успехи биол. химии. 1988. – Т. 28. – С. 125–144.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб / Н. Н. Немова. – Петрозаводск: Изд-во КНЦ РАН, 1996. – 121 с.

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

Немова Н. Н., Сидоров В. С. Внутриклеточное распределение и активность катепсинов в яйцах сига до и после оплодотворения // Онтогенез. 1980, № 1. С. 85–87.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Изменение ферментов лизосом при белковой недостаточности // Биохимия. 1968. Т. 33. N 4. С. 809–816.

Чекунова М. П., Фролова А. Д. Роль лизосом в токсикологии металлов // Структура и функции лизосом: Тез. Докл. 3-го Всесоюз. симпоз. Тбилиси: ХОЗУ Минуралсибстроя СССР, 1984. С. 228–229.

Braedford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analit. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

Moore M.N. Cellular responses to pollutant // *Mar. Pollut. Bull.* 1985. Vol. 16. P. 134–139.

Nemova N., Bogdan V., Smirnov L. et al. Biochemical indication of mercury accumulation in fish // *Toxicol. And Pharmacol.* 2004. Vol. 197, N 3. P. 273.

INFLUENCE OF HEAVY METALS (CD, CU) ON THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES MUSSEL *MYTILUS EDULIS* L.

M.Y. Krupnova, N.N. Nemova, V.S. Skidchenko

*Institute of biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russia*

Activity of lysosomal proteinases varies depending on the type of active metal, its concentration and exposure time. On set of observations, it is obvious

that the presence of copper stimulates compensatory changes, while cadmium depressing effect on calcium-dependent proteolysis.