

ВЛИЯНИЕ Sr^{2+} НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ Ca^{2+} -ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ РЫБ

Л. А. Лысенко¹, Н. П. Канцера¹, Е. И. Кийвярайнен¹, Н. Н. Немова¹, Н. А. Кашулин²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия, e-mail: l-lysenko@yandex.ru

² Учреждение Российской академии наук Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН, г. Апатиты Мурманской обл., Россия

Введение

Загрязнение водоемов тяжелыми металлами – один из наиболее распространенных видов антропогенного воздействия. В тканях многих водных организмов, включая планктонные, бентосные виды, моллюсков, рыб, накапливаются тяжелые металлы (Брень, 1999; Попов и др., 2002), при этом зачастую наблюдается прямая корреляция между концентрациями металлов в донных седиментах (антропогенной составляющей) и гидробионтах. Степень накопления металла в тканях рыб является переменной величиной, находящейся в тесной взаимосвязи с геохимическими условиями среды их обитания (концентрации металла, биодоступности его соединений, температуры, pH и жесткости воды), с генеративным и пластическим обменом у рыб и другими факторами. Обнаруживаемые в организме концентрации металлов отражают разницу между количеством поглощенного элемента (нагрузка) и выведенного из организма. Аккумулированные металлы вызывают метаболические нарушения в органах рыб и беспозвоночных. Хроническое поступление стронция в окружающую среду, например, в составе стоков металлургического производства, вызывает дозо- и время-зависимое накопление металлов в живых организмах и представляет для них серьезную опасность из-за выраженной способности этого токсичного элемента к накоплению в тканях, особенно костной.

Проведены исследования биохимических параметров в тканях рыб сем. Сиговые, сига обыкновенного, *Coregonus lavaretus* (L.), и ряпушки европейской, *Coregonus albula* (L.), выловленных в 2003 г. в озерах Ковдор и Нижняя Пиренга (Мурманская обл.). Для более детального понимания причин нарушений, на-

блюдаемых у рыб озера Ковдор на организменном и популяционном уровнях, сотрудниками ИППЭС КНЦ РАН было проанализировано содержание металлов (никеля, меди, цинка, марганца, стронция и других) в органах сига и ряпушки (Кашулин, 1999; Королева, 2001). По результатам их исследований приоритетным загрязнителем вод оз. Ковдор признан стронций. Стронций (Sr) представляет серьезную опасность для позвоночных животных из-за его структурного сходства с кальцием (Ca), которое обуславливает способность Sr замещать Ca в костной и других тканях. Следствием этого является нарушение обмена кальция в организме, а также его участия в кальций-зависимых метаболических процессах. В представленной работе с целью выявления возможного механизма действия стронция анализируются структурно-функциональные изменения в одной из протеолитических систем клетки, регулируемой внутриклеточным Ca^{2+} , а именно Ca^{2+} -активируемых протеиназ (кальпаинов) и их специфического эндогенного ингибитора (кальпастина).

Материалы и методы

Объектами исследования были рыбы сем. Сиговые сига *Coregonus lavaretus* (L.) и ряпушка *C. albula* (L.) из водоемов Мурманской обл., различающихся по степени техногенного загрязнения – оз. Нижняя Пиренга (контроль) и оз. Ковдор (опыт).

Гидробиологическая характеристика исследуемых озер

Качество вод озера Нижняя Пиренга является удовлетворительным, хотя присутствуют несколько дистанцированных (25–70 км) ис-

точников загрязнения: горно-обогатительные предприятия ОАО «Ковдорский ГОК», ОАО «Ковдорслюда» и рудник «Енский». Содержание потенциально опасных элементов, таких как цинк, медь, никель, кобальт, хром, кадмий, в этом озере не превышает ПДК для рыбохозяйственных водоемов (табл. 1). По оценке биомассы зоопланктона озеро оценивается

как малокормное. Анализ уловов 2003 года показал, что преобладающим видом рыб в озере (86%) является сиг *C. lavaretus* L., а именно его малотычинковая форма. Соотношение полов в период отлова составляло 1 : 1,1 с незначительным преобладанием самок. Сиги озера Н. Пиренга имеют высокий коэффициент упитанности – 1,32.

Таблица 1. Содержание элементов (мкг·л⁻¹, средние величины) в исследуемых водоемах

	Cu	Ni	Cr	Co	Cd	Zn	Mn	Al	Sr
Оз. Ниж. Пиренга	0,5	1,1	1,3	<0,2	<0,05	0,7	5,0	23	64
Оз. Ковдор	1,5	1,2	0,85	1,5	<0,05	2,2	30	83	1210

Оз. Ковдор испытывает значительную антропогенную нагрузку со стороны горнообогатительных комбинатов, и в наших исследованиях рыбы из этого озера рассматривались как опытная группа. Гидрохимический состав оз. Ковдор характеризуется высоким содержанием ионов никеля, цинка, марганца, кобальта, алюминия и стронция (табл. 1). Оз. Ковдор характеризуется средним и в отдельных зонах повышенным уровнем трофности, кормовая база оценивается как достаточная. В исследуемый период значительно сократились уловы рыб. Доля сиговых рыб в уловах составляет более 99%, при этом по численности и биомассе доминирует ряпушка *C. albulus* L. (планктонофаг), а сиг (бентофаг) практически отсутствует. Сиги оз. Ковдор представлены двумя формами: малотычинковой, характеризующейся бентосным или смешанным типом питания, и среднетычинковой, питающейся преимущественно зоопланктоном. Соотношение полов в изучаемый период составляло 1,2 : 1 с незначительным преобладанием самцов. Сиги, обитающие в оз. Ковдор, имеют высокий коэффициент упитанности – 1,4, при этом более 45% особей характеризуются максимальными значениями жиронакопления (в баллах), часто встречается ожирение сердца. Характерно, что у нерестовых самок обнаруживаются значительные количества полостного жира, что нехарактерно для рыб из северных водоемов. Наряду с этим, для сигов оз. Ковдор характерно развитие ряда патологий внутренних органов пищеварительной, выделительной и репродуктивной систем, снижение темпов роста и продолжительности жизни, раннее созревание и др. Более чем у 50% выловленных рыб наблюдались измененные цвет и форма печени, соединительно-тканые разрастания и атрофия паренхимы почек. Не-

обходимо указать на ухудшенные органолептические качества сигов, обитающих в оз. Ковдор: филе рыб имеет ярко выраженный посторонний вкус и запах, усиливающийся при термической обработке.

Выделение и изучение свойств кальпаинов и кальпастина из органов рыб

Активность и структурно-биохимические характеристики Ca²⁺-зависимых протеиназ цитозоля (кальпаинов) и их белкового ингибитора кальпастина оценивали после предварительной гель-хроматографии образцов на колонках (2,5×95 см) с гелем Сефакрил S-300 (Pharmacia), уравновешенным буфером А (10 mM трис-HCl (pH 7,5), содержащим 50 mM NaCl, 4 mM EDTA, 5 mM меркаптоэтанол). Наносили 25%-ные супернатанты цитозольной фракции тканей () рыб (105 тыс.г×60 мин) в буфере А, содержащем 0,25 М сахарозы (pH 7,5). Элюцию проводили со скоростью 24 мл/ч буфером А, во фракциях элюента объемом 4 мл определяли активность Ca²⁺-активируемых протеиназ стандартным методом по гидролизу щелочно-денатурированного казеина (Murachi et al., 1981)[17]. Реакционная смесь для обоих кальпаинов включала 0,4% казеина, 5 mM дитиотреитола, 50 mM имидазол-HCl буфера (pH 7,5) и ферментный раствор, инкубация проводилась в присутствии 3,0 mM CaCl₂ (в холостые пробы кальций добавлялся после инкубации). По истечении 30 мин. инкубации (30 °C) реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 10% ТХУ. Концентрацию кислоторастворимых продуктов гидролиза определяли спектрофотометрически (E₂₈₀). Единица активности (ЕА) кальпаинов определялась как количество фермента во фракции, вызывающее увеличение на 1,0 оптического поглощения (E₂₈₀) за 30 мин. инкубации (30 °C).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили стандартным методом (Laemmli, 1970); разделяющий гель 13,5%, концентрирующий – 7,5%. Нагревание проб не проводилось, учитывая высокую нестабильность ферментов. Окраска гелей проводилась Coomassie blue (Hames, 1990). В качестве маркеров использовали стандартную смесь белков с известными молекулярными массами (SDS 6H, Sigma-Aldrich).

Количественное содержание водорастворимого белка в тканях (мг/мл центрифугата) определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Математическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики в среде пакета программ StatGraphics; достоверность различий оценивали при помощи непараметрического критерия U (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) (Коросов, Горбач, 2007).

Результаты и обсуждение

Накопление металлов в органах рыб

Стронций – наиболее интенсивно аккумулирующийся в тканях-мишенях рыб тяжелый металл из состава загрязнителей оз. Ковдор (табл. 2).

Таблица 2. Содержание элементов ($\text{мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого веса, средние величины) в органах сига из оз. Ковдор (по данным Кашулин, 1999; Королева, 2001)

Орган	Cu	Ni	Cr	Co	Cd	Zn	Mn	Al	Sr	n
Жабры	1,8	1,7	0,4	0,6	0,01	283	16,9	32	412,2	16
Печень	18,9	0,6	0,03	0,4	0,09	225	8,29	4,80	2,6	16
Почка	6,5	0,8	0,1	2,2	0,34	217	3,0	24	10,9	16
Мышцы	1,2	0,8	0,04	0,14	0,00	26	1,1	2,7	15,1	16
Скелет	0,5	1,2	0,07	1,2	0,00	164	16,8	11,1	1243	16

В исследовании выявлена органная специфичность накопления стронция и других тяжелых металлов у рыб исследованных видов (табл. 3). Так, стронций накапливается в костной ткани сигов в очень высоких концентрациях: в скелете его концентрация приближается к содержанию элемента в воде ($1243 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ и $1210 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$, соответственно), в других органах уровень накопления значительно ниже. Значительные количества обнаруживаются в жабрах, ниже уровень в скелетных мышцах и почках, в печени аккумуляция минимальная. Таким образом, содержание Sr особенно высоко в органах, выполняющих частично или полностью опорную функцию и состоящих из костной ткани, в жабрах такими опорными элементами являются скелетные жаберные дуги. Накопление металла в паренхиматозных органах (печень, почки) и скелетных мышцах минимальное. У ряпушки наиболее высокие концентрации Sr также обнаружены в костной ткани, в жабрах его содержание почти в 3 раза ниже, а в паренхиматозных органах и мышцах на порядок ниже, чем в скелете. Характерно, что в скелетных мышцах рыб, богатых кальцием, накопление данного элемента выше, чем в почках и печени. Межвидовые различия достоверны; уровень накопления стронция в тканях сигов выше, чем у ряпушки.

Таблица 3. Содержание Sr в органах рыб ($\text{мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сухого веса) из оз. Ковдор (по данным Кашулин, 1999; Королева, 2001)

	Сиг	Ряпушка
Печень	2,6	5,0
Почка	10,9	6,3
Мышцы	15,1	13,9
Жабры	412	283
Скелет	1243	767

Обнаружение кальпаинов в органах рыб

Для разделения кальпаинов, имеющих незначительные отличия по молекулярной массе, и их ингибитора кальпастина проводили фракционирование цитозольной фракции тканей рыб при помощи гель-фильтрации на Сефакриле S300 в буфере, содержащем хелатор двухвалентных катионов ЭДТА. Общепринятыми методами тестирования активности кальпаинов во фракциях белкового элюента тканей рыб с молекулярными массами 120, 110 и 80 кДа (условно обозначаемых А, В и С) была обнаружена Ca^{2+} -зависимая казеинолитическая активность. Ферменты указанных фракций проявляют каталитическую активность *in vitro* в присутствии 120 мкМ (фракция А), 1,5 мМ (фракция В) и 1,0 мМ (фракция С) ионов кальция. Соотношение активностей в разных фракциях фермента имеет органную специфичность. Данные гель-фильтрации образцов с последующим электрофоре-

зом в ПААГ с ДСН свидетельствуют о том, что протеиназы фракций А и В состоят из двух различных субъединиц с молекулярными массами приблизительно 80 и 27 кДа, то есть в нативном состоянии имеют структуру гетеродимеров, фракция С включает смесь двух полипептидов с молекулярными массами близкими 80 кДа. По совокупности экспериментальных данных (димерная структура, молекулярная масса субъединиц, чувствительность к кальцию) можно отнести протеиназу фракции А к гомологам μ -кальпаина человека, протеиназу фракции В – к гомологам m -кальпаина человека, а пик С, предположительно, является смесью их каталитических субъединиц.

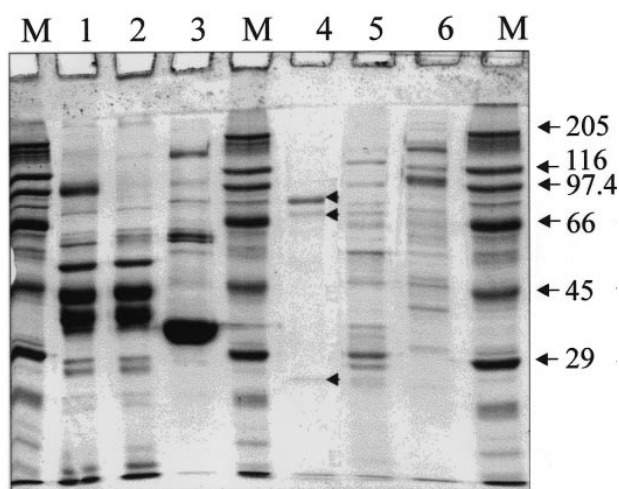


Рис. 1. ПААГ-электрофореграммы препаратов кальпаинов и кальпастина из мышц сига

Дорожка 1 – грубый экстракт; 2 – кальпастин-содержащая фракция; 3 – активная кальпаин-содержащая фракция; далее – фракции после деления на колонке с сефакрилом S300: 4 – С-фракция кальпаина; 5 – В-фракция кальпаина; 6 – А-фракция кальпаина; М – маркеры (подписаны справа): миозин 205 кДа; β -галактозидаза 116 кДа; фосфорилаза b 97,4 кДа; бычий альбумин 66 кДа; овальбумин 45 кДа; карбангидраза 29 кДа.

Выделенные ферменты оказались чувствительны к групповым ингибиторам цистеиновых протеиназ (лейпептину, E64) и агентам, алкилирующим SH-группы (йодоацетату, N-этилmaleимиду, Hg^{2+}), но не к ингибиторам протеиназ других типов (пепстатину, PMSF); кроме того, активность протеаз всех трех выделенных фракций угнеталась в присутствии кальпастин-содержащей фракции (170 кДа). Чувствительность к ингибиторам, абсолютная потребность в ионах кальция для проявления протеолитической активности и нейтральный pH оптимум позволили однозначно отнести изучаемые ферменты к цис-

теиновым протеазам (клан СА) семейства кальпаинов С2 согласно современной классификации протеолитических ферментов (Rawlings et al., 2010).

Сходство выделенных ферментов рыб с классическими μ - и m -кальпаинами млекопитающих подтверждается также данными о термостабильности ферментов; так, предполагаемый гомолог m -кальпаина (фракция В) утрачивает более 50% активности при прогревании препарата при 58 °С в течение 5 мин., в то время как фракции А и С более термостабильны. Указанный температурный критерий ранее предложен японскими исследователями (Toyohara et al., 1985) для различения форм кальпаинов млекопитающих.

Подтверждено присутствие в тканях рыб эндогенного ингибитора кальпаинов – кальпастина, который соэлюируется с колонки сефакрила S300 с белковой фракцией 170 кДа и обладает ингибирующим действием на фракции фермента А и В. Поскольку оценка молекулярного веса кальпастина проводилась методом эксклюзионной хроматографии с использованием в качестве стандартов сферических молекул белков, то молекулярный вес кальпастина, имеющего конфигурацию спирали (Goll et al., 2003), по всей вероятности, значительно завышен. Действительно, на ПААГ-электрофореграмме препарата кальпастина выявляется смесь полипептидов, молекулярные массы которых значительно ниже тех, что обнаруживаются с помощью гель-фильтрации – от 17 до 53 кДа, что согласуется с данными М. Сэлем с сотрудниками (Salem et al., 2005) о кальпастинах из *O. mykiss* и *D. rerio*. Ингибирующая активность кальпастин-содержащей фракции (170 кДа) из тканей рыб сохранялась при ее прогревании при 100 °С в течение 20 мин, что подтверждает высокую термостабильность ингибитора, также свойственную кальпастинам из других источников.

Таким образом, из тканей рыб были выделены гомологи двух форм кальпаинов, характеризующихся широкой тканевой экспрессией и универсальных для всех позвоночных животных, так называемых «повсеместных» кальпаинов – μ -кальпаина и m -кальпаина. Указанные протеазы имеют гетеродимерную организацию и состоят из каталитической 80 кДа (уникальной для каждой формы) и регуляторной 28 кДа субъединиц; в процессе очистки ферменты частично подвергаются диссоциации. Тканеспецифичные формы кальпаинов, характерные для млекопитающих, у рыб обнаружены не были;

информация о них также отсутствует в литературе. Кроме того, из тканей рыб была выделена кальпастин-содержащая белковая фракция, обладающая ингибирующей активностью по отношению к ферментам фракций А и В (гетеродимерам).

*Функциональная активность
кальпаин-кальпастиновой системы
в органах рыб в присутствии Sr^{2+}*

Показаны отличия в активности внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеаз во всех изученных органах сигов из оз. Нижняя Пиренга и Ковдор (табл. 4). Характерно, что в мышцах, печени и жабрах рыб из загрязненного озера наблюдается снижение активности кальпаинов. Снижение данного показателя белкового обмена наиболее значительно при расчете удельной активности (то есть в пересчете на концентрацию тканевых белков). Известно, что одним из механизмов токсического действия Sr^{2+} является его конкуренция с двухвалентными катионами. В литературе описан ряд ситуаций, когда Sr^{2+} действует как аналог Ca^{2+} во внутриклеточных про-

цессах, например, он способен активировать Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы примерно на 1/4 от эффективности Ca^{2+} . Вытеснение кальция стронцием из Ca^{2+} -связывающих белков, в том числе Ca^{2+} -зависимых протеаз, при наличии у Sr способности к активации кальпаинов – вероятное объяснение наблюдаемого частичного подавления активности кальпаинов. Закономерным исключением являются биохимические изменения, происходящие при действии стронция в гонадах рыб. Вследствие ежегодного обновления этой ткани, накопление тяжелых металлов в гонадах незначительно. Интересно, что в этом случае наблюдается активация кальпаинов, характерная для развития адаптивных перестроек в тканях при действии различных токсикантов. Подобное увеличение общей активности кальпаинов наблюдалось в жабрах и мышцах окуня, *Perca fluviatilis*, из водоемов Карелии с повышенным содержанием ртути (Немова и др., 2001; Бондарева, 2004) и у бокоплавов и мидий из загрязненных участков Канда拉克шской губы Белого моря (Бондарева, 2004; Бондарева и др., 2005).

Таблица 4. Активность кальпаинов (ЕА) в тканях самцов сига из оз. Ниж. Пиренга (контроль)/Ковдор (опыт)

Орган	Ca^{2+} -зависимая казеинолитическая активность, ЕА					Белок, мг/мл
	Фракция А	Фракция В	Фракция С	Суммарная	Удельная	
мышцы	0,180	0,140	0,040	0,360	0,026	13,8
	0,185	0,140	0,045	0,365	0,023	16,2
жабры	0,500	0,125	1,50	2,125	0,343	6,2
	0,620	0,580	0,02	1,200	0,162	7,4
печень	0,405	0,100	0,085	0,590	0,046	12,8
	0,270	0,050	0,015	0,335	0,020	16,8
гонады	0,080	0,070	0,065	0,215	0,034	6,3
	0,035	0,160	0,045	0,240	0,042	5,7

Наиболее высокие физиологические значения активности кальпаинов обнаружены в жабрах (табл. 4), при этом для жаберного аппарата рыб из загрязненного озера характерно наиболее выраженное подавление активности кальпаинов по сравнению с изменениями в других органах; по-видимому, это связано с барьерной функцией жабр, испытывающих активное воздействие токсичных компонентов среды. Выявленное снижение функциональной активности кальпаинов – ферментов не только деградации белков, но и внутриклеточных регуляторов – по всей видимости, приводит к подавлению кальпаин-зависимых клеточных процессов (передачи импульсов, формирования скелетных мышц, апоптотического пути гибели клеток и других), что, несомненно, отражается на процессах жизнедеятельности организма.

*Механизмы регуляции активности
кальпаинов, изменяемые в присутствии Sr^{2+}*

Механизмы регуляции активности кальпаинов достаточно сложны и не до конца изучены, хотя известно, что присутствие Ca^{2+} необходимо на следующих этапах их функционирования: 1) связывание протеаз с внутриклеточными элементами, 2) конформационный переход с образованием каталитически активного кальпаина (активация), 3) автолиз, 4) диссоциация субъединиц и 5) связывание со специфичным эндогенным ингибитором, кальпастином.

В функционировании кальпаинов в клетках остается неразрешенным ряд вопросов. Основной из них – очень высокая потребность в Ca^{2+} (в миллимолярной области) для активации кальпаинов, в то время, как в живых клетках

обнаруживается миллимолярный его уровень. Один из возможных механизмов снижения потребности в кальции – связывание кальпаинов с биомембранами, осуществляемое за счет малой субъединицы. Также известно, что автолизированным кальпаинам требуются значительно более низкие концентрации кальция для активации, сравнимые с присутствующими в живых клетках. Ряд авторов, однако, утверждают, что активация кальпаинов не зависит от автолиза, и неавтолизированные кальпаины обладают высокой протеолитической активностью. Автолиз изучаемых протеаз заключается в отщеплении *N*-концевых фрагментов их 28 кДа и 80 кДа субъединиц и происходит при концентрации Ca^{2+} , несколько более высокой, чем необходима для проявления их протеолитической активности. Пока неясно, является ли автолиз необходимым этапом для инициации протеолитической активности кальпаинов, так как известно, что пропептиды его субъединиц не блокируют стерически активный центр. Эффект автокаталитического расщепления на потребность ферментов рыб в Ca^{2+} еще не установлен. Результаты автолиза детектировали методом ПААГ-электрофореза с ДСН. Субъединица 80 кДа быстро автокаталитически деградирует с образованием двух полос (73 и 69 кДа), которые можно выявить только в течение очень короткого времени с начала автолиза. У других организмов обычно продукты автолиза имеют молекулярные массы 78 и 76 кДа. Выявляются также три основные полосы (59, 43 и 28 кДа) и минорные полосы промежуточных молекулярных масс. Малая субъединица (24 кДа) деградирует с образованием трех фрагментов: 22, 19,3 и 17,8 кДа, их принадлежность к малой субъединице доказана при помощи иммуноблоттинга с антисывороткой против малой субъединицы. Ladrat с сотр. (2002) использовали в качестве активаторов кальпаина морского окуня 5 мМ Ca^{2+} или 8 мМ Sr^{2+} , при этом продукты автолиза фермента качественно не различались. Эти результаты подтверждают аналогичную роль Sr^{2+} и Ca^{2+} как индукторов автолиза кальпаинов со структурной точки зрения. Также детально изучен автолиз *m*-кальпаина из скелетных мышц лягушки в присутствии различных двухвалентных катионов (Sargianos et al., 1995). Полосы белковых фрагментов, обладающих различной электрофоретической подвижностью, оказались сходными при обработке любым из изученных металлов, различалась лишь степень гидролиза.

В изученных тканях рыб была зафиксирована активность, проявляемая изолированными 80 кДа субъединицами кальпаинов. Это согласуется с данными многих недавних исследований, четко показавших наличие в клетках активности каталитических полипептидов 80 кДа. Диссоциация гетеродимерных кальпаинов – также Ca^{2+} -опосредуемый процесс. В тканях рыб из озера Ковдор («опыт») отмечалось снижение протеолитической активности субъединиц 80 кДа; исключение составляют скелетные мышцы, для которых из-за особенностей физиологии характерно высокое содержание Ca^{2+} .

При возрастании во внутриклеточной среде содержания ионизированного кальция или его структурного аналога, катиона Sr , комплекс кальпаин-кальпаистатин распадается, и кальпаин выходит из-под контроля своего ингибитора и вызывает усиленную деградацию кальпаин-чувствительных белков.

Так, результаты нашего исследования и данные литературы свидетельствуют о том, что в присутствии Sr^{2+} изменяются все регуляторные этапы, обеспечивающие нормальное функционирование внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы, а именно, автолиз, активация, диссоциация и ингибирование.

В подтверждение наших выводов о способе взаимодействия Sr и Ca^{2+} как регуляторов процессов на молекулярном уровне был проведен эксперимент *in vitro* с использованием полученных препаратов кальпаинов рыб. Была протестирована способность различных двух- и трехвалентных катионов (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) активировать кальпаины (ионы добавлялись в концентрации 2,5 мМ в составе хлоридов). Как и ожидалось, Ca^{2+} – наиболее эффективный активатор кальпаинов (его эффективность принята за 100%) (рис. 2). Однако, и в присутствии Sr^{2+} ферменты активируются до 66% от уровня активности, индуцируемого Ca^{2+} . Значение максимальной казеинолитической активности кальпаинов при использовании этих катионов сходно и составляет $0,110 \pm 0,0085$ ЕА (для его достижения потребовались концентрации 2,2 мМ Ca^{2+} и 5,9 мМ Sr^{2+}). Ранее уже была показана способность Sr^{2+} и Ba^{2+} к активации кальпаинов из разных источников (рыб, осьминога, водных грибов) (Taneda et al., 1983; Yoshimura et al., 1983; Ojha, Wallace, 1988; Toyohara, Makinodan, 1989; Hatizisis et al., 1996), однако, они действуют в этом качестве с меньшей эффективностью, чем Ca^{2+} .

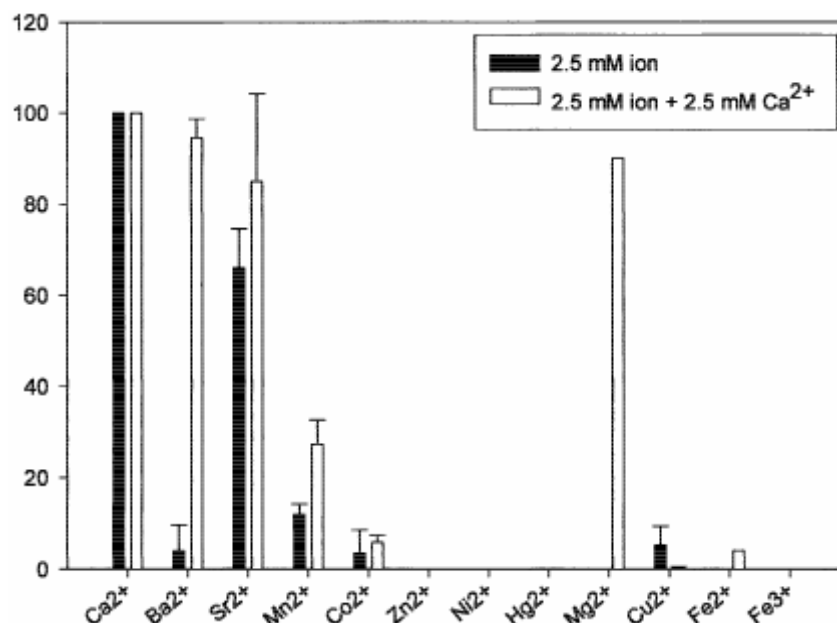


Рис. 2. Эффект различных катионов на кальпаин фракции В из мышц сига

Ca²⁺-индуцированная активность принята за 100%. Показана относительная казеинолитическая активность кальпаина как в присутствии индивидуального катиона (2,5 мМ), так и при совместном добавлении изучаемого катиона и Ca²⁺.

Эффект действия других двух- и трехвалентных катионов варьирует от слабой активации до полного ингибирования. В некоторых случаях слабая (менее 10% от Ca²⁺-индуцированной) активация кальпаинов обнаруживалась в присутствии Mn²⁺ (Edmunds et al., 1991), а также Ba²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺. Такие катионы, как Zn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺ неэффективны для активации кальпаинов в изученной концентрации (2,5 мМ). Выраженное снижение Ca²⁺-индуцированной активности вызывают Mn²⁺, Co²⁺ и Fe²⁺. Полное ингибирование – Zn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺ и Fe³⁺. Mg²⁺ не обладает самостоятельным действием на кальпаины и не изменяет их активацию Ca²⁺.

Ионы Hg²⁺ полностью угнетают активность кальпаинов *in vitro*, сходный эффект также наблюдался *in situ* у рыб при изучении закисленных и загрязненных ртутью озер (Немова и др., 2001). Сходство наблюдаемых эффектов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* позволяет в определенной степени переносить результаты экспериментов *in vitro* в натурные исследования для объяснения эффектов организменного уровня.

Особенности биологического действия Sr²⁺

Известно, что Sr²⁺ токсичен для человека в той же степени, что и Ba²⁺. Есть эксперимен-

тальные данные о том, что Sr²⁺ действует как аналог Ca²⁺ во многих внутриклеточных процессах. Указанные катионы – Ca²⁺, Sr²⁺ и Ba²⁺ – члены одной группы элементов периодической системы, что предполагает не только определенные черты структурного сходства, но и, как показали наши эксперименты, сходство в механизмах взаимодействия с биомолекулами. Так, они способны активировать кальпаины, выделенные из разных организмов. Индивидуальное действие этих катионов на кальпаины на разных этапах их функционирования, а также взаимодействие катионов друг с другом еще не изучены в полной мере, однако, можно предположить, что они могут оказывать сопряженное действие, ослабляя или усиливая действие партнера, аналогично их роли активаторов кальпаинов *in vitro*. Относительное содержание ионов Ca²⁺ и Sr²⁺ в живых клетках не всегда технически возможно установить; но оценка физиологических реакций на поступление трэйс-элемента и других двухвалентных ионов помогает существенно дополнить сведения о химизме изучаемой металл-зависимой ферментной системы.

Следует отметить, что ответные реакции рыб на загрязнение оценивали комплексно, по ряду параметров. О нарушениях в метаболизме рыб, особенно сегов, из загрязненного водоема, наряду со снижением протеолитических процессов в цитозоле, свидетельствуют изменения других биохимических параметров клеточного метаболизма, изученных в нашей лаборатории, а также показатели популяционного неблагополучия

указанных видов. В условиях хронического загрязнения популяции сига и ряпушки имеют повышенное жиронакопление по сравнению с практически чистыми районами. Сравнительный анализ активности ферментов белкового, углеводного обмена и уровня активности одного из основных ферментов метаболизма ксенобиотиков – цитохрома Р-450 показал, что защитные возможности метаболизма у сигов из оз. Ковдор резко снижены (Морозов и др., 2007; Нефедова и др., 2007). Биохимический статус ряпушки из оз. Ковдор, загрязненного отходами металлургического производства, сравнивали не только с состоянием рыб из оз. Ниж. Пиренга, но также с ряпушкой из оз. Сямозеро (также относительно чистого водоема Карелии); в обоих случаях по показателям соотношения фракций триацилглицерина / фосфолипиды (в том числе фосфатидилхолин и сфингомиелин), содержания коллагена, активности коллагеназы и некоторых других можно сделать заключение о негативных изменениях в метаболизме рыб из загрязненного водоема, которые могут, прежде всего, отразиться на воспроизводстве рыб.

Отсутствие старших возрастных групп сигов в загрязненном водоеме – показатель неблагоприятной экологической ситуации, поскольку для природной структуры данного вида в незагрязненных озерах характерно преобладание возрастных групп 7+, 8+, 9+ (Крогиус, 1926). Подобная тенденция к омоложению стада наблюдалась в условиях токсичной нагрузки и в других водоемах Кольского полуострова (например, оз. Имандра). Возраст репродуктивной зрелости сигов в загрязненном водоеме наступает при экстремально малых для данного вида размерах – малотычинковые сиги созревают в возрасте 3+ при длине тела 23 см, многотычинковые – 1+, 9,5 см (Шарова, 1999), что для водоемов Кольского Севера считается ранним, как правило, в северных озерах сиги созревают в возрасте пяти, а чаще 6–7 лет. Предполагается,

что раннее созревание наступает при напряженных условиях существования и часто связывается с неблагоприятной экологической обстановкой (Решетников, 1980; Моисеенко, 1997).

Выводы

1. Анализ содержания тяжелых металлов в органах сиговых рыб из загрязненного оз. Ковдор выявил преимущественное накопление стронция в скелетных элементах в сравнении с паренхиматозными органами. Уровень содержания стронция в костной ткани рыб является показательным при данном типе загрязнения водоемов и может быть использован в мониторинговых исследованиях.

2. У организмов, в органах которых аккумулируется Sr^{2+} , изменяются все регуляторные этапы, обеспечивающие нормальное функционирование внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы, а именно, автолиз, активация, диссоциация и ингибирование.

3. Снижение общей протеолитической способности кальпаинов можно расценивать как неблагоприятный прогностический признак, свидетельствующий о неблагополучии на организменном уровне.

4. По комплексу параметров клеточного обмена и популяционных показателей ряпушка признана более устойчивым видом к загрязнителям оз. Ковдор.

5. Функциональные показатели внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы позволяют предложить их в качестве дополнительного биотеста при оценке качества водоемов по состоянию обитающих в них рыб.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты № № 08-04-01140, 09-04-90733), Президента РФ НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

Бондарева Л. А. Влияние некоторых факторов среды на внутриклеточный протеолиз у гидробионтов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2004. 24 с.

Бондарева Л. А. Ca^{2+} -активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. 2002. Т. 4. № 1. С. 52–57.

Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., Крупнова М. Ю., Шкляревич Г. А. Влияние загрязне-

ния прибрежной акватории Белого моря на внутриклеточный протеолиз у бентосных беспозвоночных // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря: мат. IX междунар. конф. Петрозаводск, 6–9 сентября 2004. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2005. С. 55–61.

Брень Н. В. Использование беспозвоночных для мониторинга загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами // Гидробиол. журнал. 1999. Т. 35. № 4. С. 75–88.

- Кашулин Н. А. Ответные реакции сига *Coregonus lavaretus* (L.) на загрязнение тяжелыми металлами // Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова восточной Фенноскандии: материалы междунар. конф. Петрозаводск, 6–10 сент. 1999 г. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. С. 132–133.
- Королева И. М. Влияние загрязнения на морфофизиологические показатели сига (*Coregonus lavaretus*) в водоемах Кольского Севера. Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Петрозаводск, 2001. 27 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск, 2007.
- Крогиус Ф. В. Ихтиологические работы на оз. Имандра // В кн. Работы Мурманской биологической станции. 2. 1926. С. 150–152.
- Моисеенко Т. И. Теоретические основы нормирования антропогенных нагрузок на водоемы Субарктики. Апатиты, 1997. 261 с.
- Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У., Немова Н. Н., Кашулин Н. А. Активность цитохрома Р-450 у сига *Coregonus lavaretus* и щуки *Esox lucius* из водоемов Субарктики при воздействии сточных вод горно-перерабатывающих предприятий // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 101–106.
- Немова Н. Н., Кяйвярйнен Е. И., Крупнова М. Ю., Бондарева Л. А., Тойвонен Л. В., Комов В. Т. Активность внутриклеточных протеолитических ферментов в тканях речного окуня *Perca fluviatilis* с различным содержанием ртути // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. № 5. С. 704–707.
- Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Немова Н. Н., Шарова Ю. Н. Особенности состава тканевых липидов сига (*Coregonus lavaretus* L.), обитающих в водоемах с разной антропогенной нагрузкой // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 107–112.
- Попов П. А., Андросова Н. В., Аношин Г. Н. Накопление и распределение тяжелых и переходных металлов в рыбах Новосибирского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42. № 2. С. 264–270.
- Решетников Ю. С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 300 с.
- Шарова Ю. Н. Особенности функционирования репродуктивной системы сига (*Coregonus lavaretus* L.) субарктических водоемов // Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова восточной Фенноскандии: материалы междунар. конф. Петрозаводск, 6–10 сент. 1999 г. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. С. 172.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976, 72: 248–254.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system // Physiol. Rev. 2003. V. 83. N 3. P. 731–801.
- Hames B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Hames B.D. and Rickwood D. (eds.). Oxford, U.K.: IRL Press, 1990. Pp. 1–147.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., Beis I.S. Purification and properties of a calpain II-like proteinase from *Octopus vulgaris* arm muscle // Comp. Biochem. Physiol. 1996. V. 113B. N 2. P. 295–303.
- Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noel J.I., and Fleurence J. Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: Polymorphism and biochemistry studies // Comp. Biochem. Physiol. 2000. V. 125 B. P. 83–95.
- Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noel J.I., Fleurence J. Milli-calpain from Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation *in vitro* // Mar. Biotechnol. (NY). 2002. V 4. N 1. P. 51–62.
- Laemmli U.K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y., Tanaka K. A quantitative distribution study on calpain and calpastatin in rat tissues and cells // Biochem. Int. 1981. V. 2. N 6. P. 651–656.
- Ojha M., Wallace C.J.A. Novel Ca^{2+} -activated neutral protease from an aquatic fungus, *Allomyces arbuscula* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 1254–1260.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. and Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38. P. D227–D233.
- Salem M., Yao J., Rexroad C.E., Kenney P.B., Semmens K., Killefer J., Nath J. Characterization of calpastatin gene in fish: Its potential role in muscle growth and fillet quality // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 141. N 4. P. 488–497.
- Sargianos N., Gaitanaki C., Beis I. Studies on the autolysis of m-calpain from the skeletal muscle of the amphibian *Rana ridibunda* // J. Exp. Zool. 1995. V. 271. P. 82–94.
- Taneda T., Watanabe T., Seki N. Purification and some properties of a calpain from carp muscle // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1983. V. 49. N 2. P. 219–228.
- Toyohara H., Makinodan Y., and Ikeda S. Detection and some properties of calpain II (high- Ca^{2+} -requiring form of calpain) from carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // Comp. Biochem. Physiol. 1985. 81B, 583–586.
- Toyohara H., Makinodan Y. Comparison of calpain I and calpain II from carp muscle // Comp. Biochem. Physiol. 1989. V. 92B. N 3. P. 577–581.
- Yoshimura N., Kikuchi T., Sazaki T., Kitahara A., Hatanaka M., Murachi T. Two distinct Ca^{2+} proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. N 14. P. 8883–8889.
- Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F., and Goll D.E. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1077. P. 197–208.

THE EFFECT OF Sr^{2+} ON INTRACELLULAR Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEASES IN FISH

L.A. Lysenko¹, N.P. Kantserova¹, E.I. Kaivarainen¹, N.N. Nemova¹, N.A. Kashulin²

¹ Institute of Biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru

² Institute of North Industrial Ecology Problems, Kola Science Centre Russian Academy of Science, Apatity,
Murmansk region, Russia

The release of strontium (Sr) to the environment is of concern due to the strong accumulation of this calcium resembling element in the bone and other tissues. The uptake of Sr^{2+} in the whitefish, *Coregonus lavaretus* and *Coregonus albula*, was studied in chemically defined freshwater lakes in Northwestern Russia including highly contaminated by Sr^{2+} Coudor Lake. The accumulation rate of Sr^{2+} in fish tissues is strongly correlated with the activity of Ca^{2+} -dependent proteases, calpains. This effect is attributed to the Sr^{2+} resembling capacity in the relation to Ca^{2+} in calcium-binding proteins and can be suggested as a part of a complex mechanism of Sr^{2+} toxicity. Calpains, having both degradative and regulatory roles, are believed to participate in signal

transduction, skeletal muscle growth, and degenerative disease. The regulatory mechanisms governing calpain activity are complex and it is known that Ca^{2+} can be involved in cellular components binding, proteolytic activity, autolysis, dissociation, and calpastatin (specific calpain inhibitor) binding. It was shown that all indicated Ca^{2+} -dependent steps in calpain activity regulation are affected by Sr^{2+} uptake in the *in vivo* experiment. Sr^{2+} was found to activate fish calpains *in vitro* to 60% of Ca^{2+} activity. Our results show that Sr^{2+} can affect calpain activity in fish following diverse pathological features in cellular metabolism. Some population effects of extremely high Sr^{2+} accumulation in fish due to metallurgy industry sewage are discussed.