

медиаторных процессов, которые включают различные физиологические и биохимические механизмы детоксикации. Один из них, физиологический, может включать в себя увеличение ЧСС, что будет способствовать усилению фильтрации гемолимфы в полости сердечной сумки, адсорбции ТМ в почечном эпителии и их последующим выведением из организма.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 08-04-92424- BONUS\_a.*

## EFFECT OF HEAVY METAL IONS ON CARDIOREGULATORY REFLEXES IN MOLLUSKS

**N.N. Kamardin, E.L. Kornienko, G.P.Udalova, S.V. Kholodkevich**

St.-Petersburg Research Center for Ecological Safety, RAS. Russia  
nik-kamardin@yandex.ru

By the electrophysiological and non-invasive on-line recording and processing of photoplethysmogram of mollusks was studied. The influence of  $Cd^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on osphradium sensory processes of *Prosobranchia* species (*Littorina littorea*, *Viviparus sp.*) and Pulmonary mollusk *Lymnaea stagnalis* was illustrated. The application of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l *L*-glutamine amino acid on osphradium surface of *Viviparus sp.* caused summary receptor potential (SRP). Solution of  $Cu^{2+}$  decreased by 51% the amplitude of the SRP. For *Lymnaea stagnalis* ions Cd modified the impulse response of osphradium neurons caused by  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l solution of *L*-aspartic acid. Injection of sea water with  $Cu^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  in the mantle cavity of *Littorina littorea* led to a short but noticeable tachycardic reaction. Long (26 days) exposure *Littorina littorea* in sea water with 45.5  $\mu\text{g/l}$  also causes tachycardia, which gradually decreased during washing in clear sea water. Possible mechanisms of influence of heavy metal ions on different levels of the chemical sensory system of mollusks and their reflection in the HR changes was discussed.

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ НЕКОТОРЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ И РЫБ

**Н.П. Канцерова<sup>1</sup>, Н.В. Ушакова<sup>2</sup>, Л.А. Лысенко<sup>1</sup>, Н.Н. Немова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия  
nkantserova@yandex.ru

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

Кальпаины – кальций-зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток живых организмов – от прокариот до млекопитающих. К настоящему времени наиболее полно изучены два белка этого семейства из тканей позвоночных –  $\mu$ (микро)- и  $m$ (милли)-кальпаины, различающиеся необходимым для активации уровнем кальция, а также их эндогенный ингибитор кальпаистатин. Сведения о кальпаин-кальпаистатиновой системе у рыб и беспозвоночных ограничены, между тем, такая информация крайне важна для установления хода молекулярной эволюции семейства. Несмотря на ограниченность структурных исследований кальций-зависимых протеиназ и кодирующих их генов у беспозвоночных и рыб, продемонстрирована роль этой внутриклеточной протеолитической системы во многих клеточных процессах (перестройке цитоскелета, пролиферации, дифференцировке, слиянии, апоптотической и некротической гибели, гаметогенезе, оплодотворении и др.), включая патологические, а также их участие в развитии ответных реакций на изменяющиеся условия окружающей среды. В данной работе приводятся результаты исследования базового уровня активности и ферментативных характеристик кальпаинов у некоторых пресноводных беспозвоночных и рыб.

Были изучены показатели у беспозвоночных 17 видов, относящихся к следующим классам: Малощетинковые черви (Олигохеты), Пиявки, Ракообразные, Насекомые, Брюхоногие и Двустворчатые моллюски, и у рыб двух видов – карася *Carassius auratus* и щуки *Esox lucius*. Материалом для исследования активности кальпаинов, как правило, служили гомогенаты целых животных, у неко-

торых видов двустворчатых моллюсков – гомогенаты мышц-замыкателей, у рыб – белые скелетные мышцы. Активность кальпаинов определяли во фракциях цитоплазматических и мембраносвязанных клеточных белков. Первый показатель отражает общий уровень ферментативного белка, второй – долю активированного (путем ассоциации с фосфолипидами мембран) фермента. У некоторых объектов были исследованы структурно-биохимические характеристики препаратов кальций-зависимых протеиназ после предварительной очистки ферментов.

Анализ полученных результатов показал, что максимальные величины удельной активности кальпаинов в цитозольной фракции характерны для представителей типа Кольчатые черви – пиявок и олигохет. У остальных исследованных гидробионтов активность кальций-зависимых протеиназ в цитозольной фракции значительно ниже (в 2–14 раз). При сравнении уровня удельной активности кальпаинов в мембраносвязанной фракции было установлено, что наивысшие значения активности также характерны для кольчатых червей, несколько меньшие – для двустворчатых моллюсков, минимальные – для членистоногих.

Установленные различия в конститутивном уровне внутриклеточной кальций-зависимой протеолитической активности у изученных видов беспозвоночных и рыб могут быть связаны как с физиологическими особенностями, так и с таксономической принадлежностью объектов. Так, ранее высказывалось предположение, что кальций-зависимые протеиназы эволюционно более древних организмов преимущественно вовлечены в базовый катаболизм клеточных белков, в ходе эволюции живого кальпаины приобретали все большее значение как высокоселективные регуляторы клеточных процессах. Действительно, наиболее высокие значения активности кальций-зависимых протеиназ характерны для представителей типа Кольчатые черви – наиболее древних и просто организованных животных среди исследованных групп беспозвоночных. Значительно ниже уровень активности кальпаинов у более прогрессивных в эволюционном отношении беспозвоночных – членистоногих. Особенностью кальпаинов низших животных, по-видимому, является низкая селективность их действия по сравнению с гомологами из теплокровных, которая отражается в более широкой субстратной специфичности и более полном гидролизе белков-субстратов (до составляющих коротких пептидов) непосредственно в цитозоле.

Исследование структурных и энзиматических характеристик кальпаинов проводили у равноногих рачков, двустворчатых моллюсков и рыб. Чувствительность исследуемых ферментов к ингибиторам цистеиновых протеиназ, абсолютная зависимость активности от присутствия ионов кальция и нейтральный pH оптимум однозначно позволяют отнести изучаемые ферменты к цистеиновым протеиназам семейства кальпаинов С2 согласно современной классификации протеолитических ферментов. На основании результатов исследования и данных литературы можно сделать вывод о том, что протеиназы изученных беспозвоночных отличаются от типичных  $\mu$ - и  $m$ -кальпаинов позвоночных животных по нескольким параметрам: 1) не содержат малой субъединицы, подобной 28 кДа субъединице; 2) могут существовать в виде мономеров или гомодимеров, но не гетеродимеров; 3) их протеолитическая активность в ряде случаев частично ингибируется PMSF и пепстатином, которые не влияют на активность кальпаинов позвоночных; 4) отсутствует эндогенный регулятор их активности – кальпастатин. Что касается концентрации кальция, необходимой для активации кальпаинов у различных групп животных, то экспериментально было доказано, что в эволюционном ряду чувствительность кальпаинов к кальцию увеличивается.

Результаты работы подтверждают и экспериментально обосновывают представления о том, что кальпаинам беспозвоночных и рыб свойственны эволюционные особенности структурной организации и регуляции активности. Обобщение полученных данных и данных литературы о структуре, свойствах, субстратной специфичности и чувствительности к кальцию кальпаин-подобных протеолитических ферментов у различных групп животных подтверждает высказанное ранее предположение, что кальций-зависимые протеиназы эволюционно более древних организмов ответственны, главным образом, за низкоселективный катаболизм клеточных белков, в то время как у более высокоорганизованных животных на первый план выходит их регуляторная функция в жизнедеятельности клетки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-01140-а, 09-04-90733-моб ст), Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие» на 2009–2011 гг., и Программы ОБН РАН «Биоресурсы» на 2009–2011 гг.*

## INTRACELLULAR CALCIUM-DEPENDENT PROTEOLYTIC ENZYMES IN SOME INVERTEBRATES AND FISH

N.P. Kantserova<sup>1</sup>, N.V. Ushakova<sup>2</sup>, L.A. Lysenko<sup>1</sup>, N.N. Nemova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology, Karelian Research Centre of RAS, Petrozavodsk, Russia

<sup>2</sup> Institute for Biology of Inland Waters of RAS, Borok, Russia  
nkantserova@yandex.ru

The biochemical properties, activity and structural features of intracellular calcium-dependent proteases (calpains) in some invertebrates and fish are considered. The correlation between the level of activity and some calpain properties with evolutionary and physiological characteristics of the studied organisms was shown.

## АКТИВНЫЙ ОБМЕН И АДАПТАЦИИ ВОДНЫХ ПОЙКИЛОТЕРМНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Л.И. Карамушко

Учреждение Российской академии наук Мурманский морской биологический институт

Кольского научного центра РАН, Мурманск, Россия

karamushkol@mmbi.info

Результаты исследования энергетики холодноводных пойкилотермных организмов показывают, что в пределах относительно узкого диапазона низких температур обитания (при которых наблюдается низкая скорость стандартного обмена и ограниченный аэробный метаболический диапазон), скорость энергетического обмена, в основном, зависит от потенциальной активности животных. По отношению к этим животным в первую очередь возникает вопрос, как холодноводные эктотермные организмы могут поддерживать максимальные аэробные скорости активного обмена и не могут ли рассматриваться низкие температуры, как фактор "давления" на их энергетику. Нами были проанализированы с позиций адаптационных возможностей организма к низким температурам среды, скорости движения и активного обмена водных пойкилотермных животных на примере рыб разных экологических групп. А также определены зависимости между скоростью минимального жизнеподдерживающего обмена и максимальной скоростью активного обмена, т.е. показатели аэробного метаболического диапазона.

Исследованные нами морские виды рыб разных экологических групп показывали значительные отличия в скоростях энергетического обмена, что по-видимому, в первую очередь связано с различиями в образе жизни этих видов и доказывает существование относительно постоянной зависимости между обменом покоя и максимальной скоростью аэробного метаболизма. Чтобы оценить, во сколько в энергетическом выражении обходится рыбам их движение, проведен анализ зависимостей расхода энергии от скорости плавания, температуры окружающей среды и ряда других параметров.

Ихтиофауна обеих полярных областей (Арктики и Антарктики) представлена почти всеми экотипами рыб, за исключением возможно только скумбриевидных форм тела (Андряшев, 1986; Zimmermann, 1997; Zimmermann, Hubold, 1998). Это означает, что скорости активного обмена у рыб разной естественной подвижности будут различаться в значительной степени, в зависимости от особенностей обитания вида, поскольку именно экологические различия в первую очередь касаются активного обмена. Андряшев (1986) отмечает также особый морфоэкологический класс жизненных форм антарктической фауны рыб – криопелагические виды, к которым относятся активно плавающие рыбы, живущие почти постоянно при температуре воды на грани замерзания (например, малый и большой широколобики, *Pagothenia brachysoma* и *P. borchgrevinki*). К представителям активно плавающих криопелагических видов рыб арктической фауны относятся широко известные *Boreogadus saida* и *Arctogadus glacialis*.

Анализ данных по скоростям и затратам энергии при движении у ряда полярных видов рыб показал, что компенсация длительного плавания, например у антарктических рыб, достигается за счет увеличения числа митохондрий в мышцах (Johnston et al., 1988). При созревании гонад содержание