

# ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ ГОДОВАЛЫХ ОСОБЕЙ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS* К КАДМИЮ

А. Ф. Жуковская, В. П. Челомин

Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева, г. Владивосток, Россия,  
e-mail: avianna@poi.dvo.ru

## Введение

В числе различных форм антропогенного воздействия на морскую среду одно из ведущих мест принадлежит возрастающему поступлению в акватории тяжелых металлов (ТМ). Общепринято, что важная роль в метаболизме металлов, как жизненно необходимых, так и токсичных для организма принадлежит металлотионеинам (Petering, Fowler, 1986; Kagi, Kojima, 1987; Roesijadi, 1991), которые так же способны выполнять и функцию антиоксиданта в организме (Thomas Muller, Rainer Schuckelt and Lothar Jaenicke., 1994; Ramana Kumari M. V., Midori Hiramatsu and Manuchair Ebadi, 1998). Однако МТ не единственная группа белков, способных связывать тяжелые металлы. На сегодняшний день некоторыми авторами (Stone et al., 1986, Jin-Sung Park, Soohee Chung, Il-Seon Park et al., 2002) так же охарактеризованы и другие металлсвязывающие комплексы.

Среди ТМ кадмий считается одним из основных поллютантов, который способен накапливаться в органах и тканях различных видов гидробионтов и вызывать в них патологические изменения и, как следствие, гибель всего организма. Однако такие гидробионты, как некоторые виды моллюсков, способны аккумулировать этот токсичный металл без какого-либо видимого патологического эффекта. Причины такой способности до сих пор остаются неизвестными.

У представителей моллюсков сем. Pectinidae (Bivalvia) были обнаружены чрезвычайно высокие концентрации кадмия в почках и пищеварительной железе даже в видах, обитающих в акваториях с низким содержанием кадмия в морской воде (Mauri et al., 1990; Viarengo et al., 1993; Bustamante and Miramand, 2004). Этот факт говорит о том, что представители сем. Pectinidae обладают высокой степенью пластичности метаболизма, благодаря которому способ-

ны адаптироваться к поступлению кадмия в окружающую среду и выживать в условиях повышенного содержания этого токсичного металла в морской воде.

Среди дальневосточных представителей сем. Pectinidae наиболее интересным является приморский гребешок (*Mizuhopecten yessoensis*), который способен накапливать высокие концентрации кадмия в мягких тканях, благодаря способности связывать этот металл с высокомолекулярными Cd-связывающими белками. Однако ничего не известно об особенностях функционирования биохимического аппарата адаптации приморского гребешка к кадмию в зависимости от возраста.

Целью данной работы являлось выявить особенности в механизмах адаптации годовалых особей (1<sup>+</sup>) приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* к высокотоксичному кадмию.

## Материал и методы

Годовалые особи приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* были отобраны из экологически чистой акватории бухты Северная залива Петра Великого Японского моря.

Пищеварительную железу приморского гребешка извлекали для дальнейшего проведения биохимических исследований. Кусочки ткани гомогенизировали в 0,02 М Трис-НСl буфере рН 8,5 в присутствии 1мМ PMSF (для ингибирования действия протеаз) и 10 мМ DTT (для предотвращения окисления сульфгидрильных групп цистеиновых остатков). Полученный гомогенат центрифугировали при 10 тыс. об. в мин. в течение 50 мин. Супернатант (цитозоль) тщательно отделяли от осадка и определяли содержание в нем Cd, Zn и Cu.

Водорастворимые цитоплазматические белки разделяли с помощью гель-хроматографии на

Supera 12 с соблюдением условий и рекомендаций, разработанных для морских организмов (Roesijadi and Fowler, 1991). Белковые фракции элюировали 0,05 М Трис-НСl в присутствии 0,15 М NaCl (рН 7,0) со скоростью протока 0,4 мл/мин. Выход фракций регистрировали при  $\lambda$  280 нм. В процессе хроматографии элюат отбирали для определения содержания Cd.

Для определения концентрации белка использовали метод Лоури (Lowry, 1951). Калибровочные кривые строили по растворам бычьего сывороточного альбумина, концентрации которого рассчитывали на основе коэффициента молярной экстинкции.

Оценка общей антирадикальной активности (TOSC – total oxuradical scavenger capacity) проводилась по способности образца ингибировать (восстанавливать) радикал-катион АВТС<sup>+</sup> (Re Roberta et al., 1999). Для получения радикал-катионов АВТС<sup>+</sup> смешивали водные растворы АВТС и персульфата калия с концентрациями 7 мкмоль/л и 2,5 мкмоль/л соответственно. Формирование АВТС<sup>+</sup> происходило в темноте при комнатной температуре в течение суток. Для оценки антирадикальной активности конечную концентрацию АВТС<sup>+</sup> довели до 0,7±0,05 единиц оптической плотности при длине волны 734 нм. В зависимости от концентрации белка в исследуемых образцах добавляли по 10–25 мкл исследуемого раствора к 3 мл радикал-катионов АВТС<sup>+</sup>, что вызывало подавление АВТС<sup>+</sup> в интервале от 20 до 70%. Реакцию проводили в темноте в течение 5 мин. Антирадикальную активность выра-

жали как процент ингибирования АВТС<sup>+</sup> по формуле: % ингибирования = 100\*(A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>/A<sub>1</sub>), где A<sub>1</sub> – оптическая плотность раствора АВТС<sup>+</sup> на длине волны 734 нм, A<sub>2</sub> – оптическая плотность раствора АВТС<sup>+</sup> в присутствии исследуемого образца. Значения антиоксидантной активности исследуемых образцов выражали как миллимолярную концентрацию тролокса на мг белка.

## Результаты

Получено, что в пищеварительной железе у контрольной группы приморского гребешка 80% всего аккумулированного кадмия содержится в цитоплазматической фракции (фракция А), при этом на 1 мг белка приходится около 0,03 мкг кадмия.

После многоэтапного фракционирования (температурное осаждение, осаждение органическим растворителем), доля цитоплазматического кадмия во фракции (фракция В), полученной после 80% ацетонного осаждения составляет 8%. Получено так же, что на 1 мг белка приходится до 0,5 мкг кадмия.

У особей, находящихся в условиях повышенного содержания кадмия в среде в цитоплазматической фракции пищеварительной железы содержится только 50% аккумулированного кадмия, при этом на 1 мг белка приходится около 0,3 мкг кадмия. На долю 80% ацетонного осадка приходится до 50% всего кадмия, содержащегося в цитоплазме, что составляет 15 мкг кадмия на 1 мг белка (рис. 1).

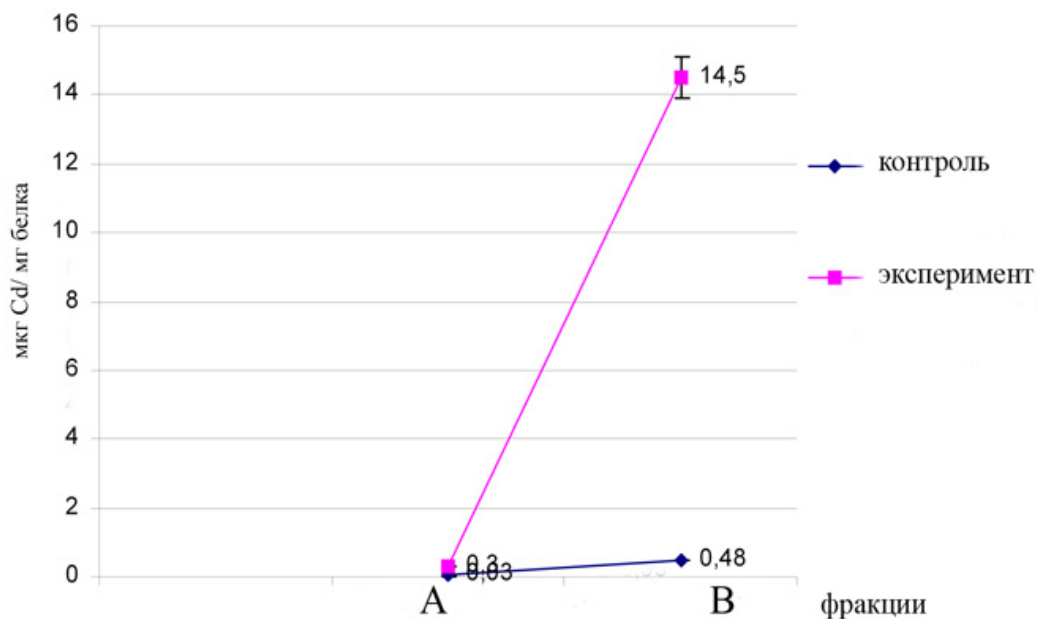


Рис. 1. Субклеточное распределение кадмия в годовалых особях приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

Анализ содержания микроэлементов показал, что кроме токсичного кадмия пищеварительная железа годовалых особей содержит и такие физиологически важные металлы, как Cu и Zn. При этом на долю термостабильных, устойчивых к органическим растворителям белков при-

ходит значительная доля цинка. Соотношение Cd: Zn : Cu фракции В составляет 1 : 3 : 1. (рис. 2).

Эксперимент по аккумуляции кадмия показал изменение в соотношении кадмия, цинка и меди (14 : 4 : 1), по сравнению с контролем (рис. 3).

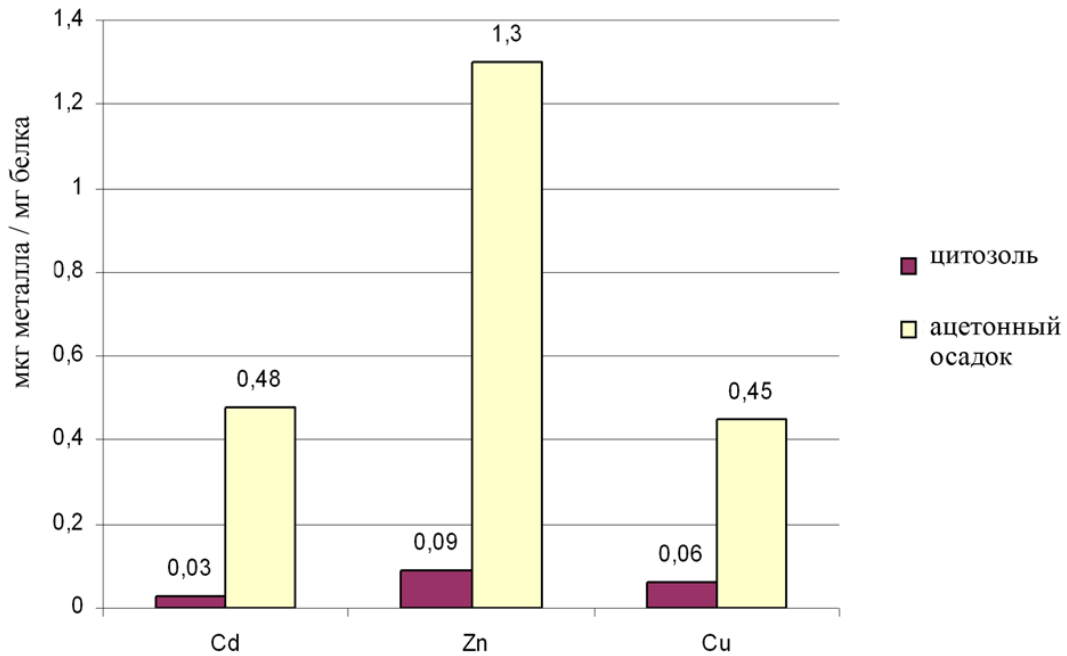


Рис. 2. Субклеточное распределение Cd, Zn Cu в пищеварительной железе контрольной группы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

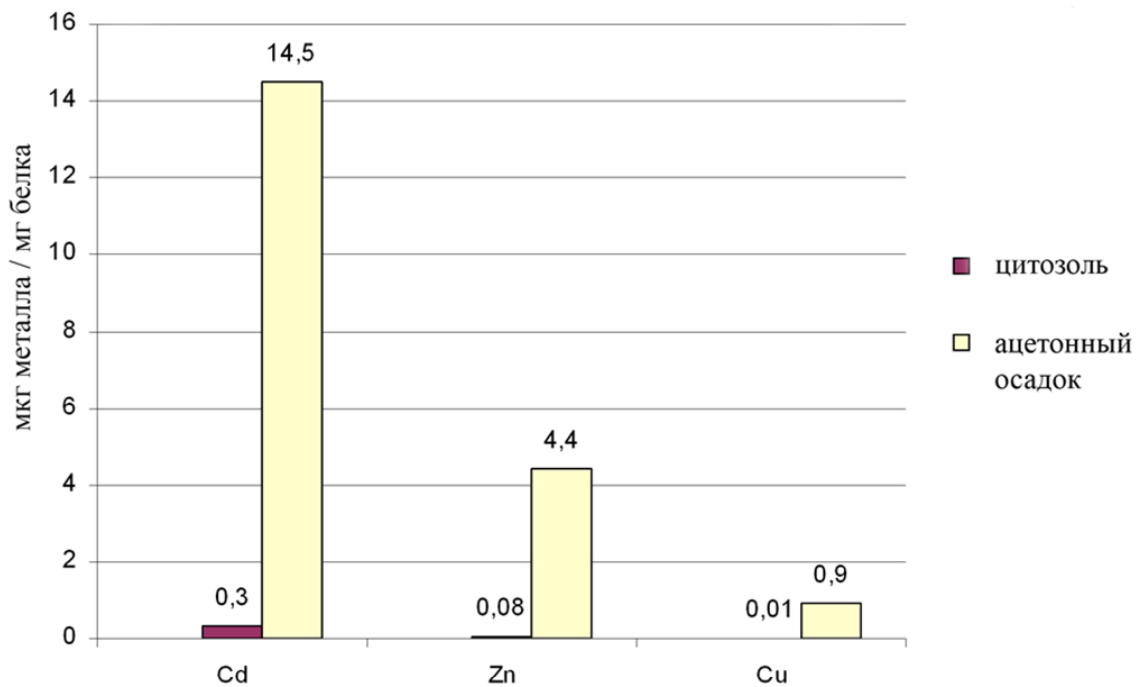


Рис. 3. Субклеточное распределение Cd, Zn Cu в пищеварительной железе годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* после инкубации кадмием ( $CdCl_2$ , 300 мкг/л)

Фракцию В, ресуспендированную в 0,02 М Tris-HCl буфере pH 8,5, разделили методом высоко скоростной проточной жидкостной хроматографии FPLC на колонке Superosa 12. Получено три кадмий-содержащих пика, соответствующих белкам с высоким молекулярным весом в области 120 кДа, 72 кДа и 43 кДа. Найдено, что все три идентифицированных белка связывают токсичный кадмий как в контрольной, так и в экспериментальной группах исследуемых моллюсков (рис. 4).

Получено, что в естественных условиях в годовалых особях *M. yessoensis* кадмий связывается главным образом с белком 43 кДа (90 мкг). Однако в особях, подвергнутых обработке кадмием, происходит перераспределение токсичного кадмия с белка 43 кДа (6 мкг) на белок 120 кДа (60 мкг). Интересно, что белок с молекулярным весом 72 кДа не менял своего сродства к кадмию вне зависимости от условий эксперимента.

Оценка антиоксидантной активности идентифицированных кадмий-связывающих белков в годовалых особях приморского гребешка *M. yessoensis* проводилась по их способности ингибировать (восстанавливать) радикал – катионы ABTS<sup>+</sup>. Изучение антиоксидантных свойств показало значительное различие в значениях как между кадмий-связывающими белками в контрольных моллюсках, так и при сравнении контрольной

группы с экспериментальной группой гребешков. Результаты показали (рис. 5), что в естественной среде обитания кадмий-связывающие белки связывают аккумулированный кадмий и имеют следующие значения: для белка 120 кДа – 86 ммоль Тролокса / мг белка, для белка 72 кДа – 114 ммоль Тролокса / мг белка и для белка 43 кДа – 109 ммоль Тролокса / мг белка.

В экспериментальных условиях для этих же белков значения антиоксидантной (АО) активности изменились (рис. 6): для белка 120 кДа – 60 ммоль Тролокса / мг белка, для белка 72 кДа – 124 ммоль Тролокса / мг белка и для белка 43 кДа – 72 ммоль Тролокса / мг белка.

Интересно, что наибольшей антиоксидантной активностью в пищеварительной железе приморского гребешка обладает кадмий-связывающий белок 72 кДа как при фоновом, так и при высоком содержании кадмия в среде. Интересно, что в условиях нагрузки кадмием этот белок не принимает участия в аккумуляции этого металла, и доля связанного кадмия с белком сравнима контролем. Получено так же, что после инкубации с кадмием кадмий-связывающие белки, принимающие основное участие в связывании кадмия (120 кДа и 43 кДа) имеют более низкие значения АО активности по сравнению с контролем. Отмечено, что кадмий-связывающий белок 120 кДа обладает более низкими показателем АО активности в обоих условиях эксперимента.

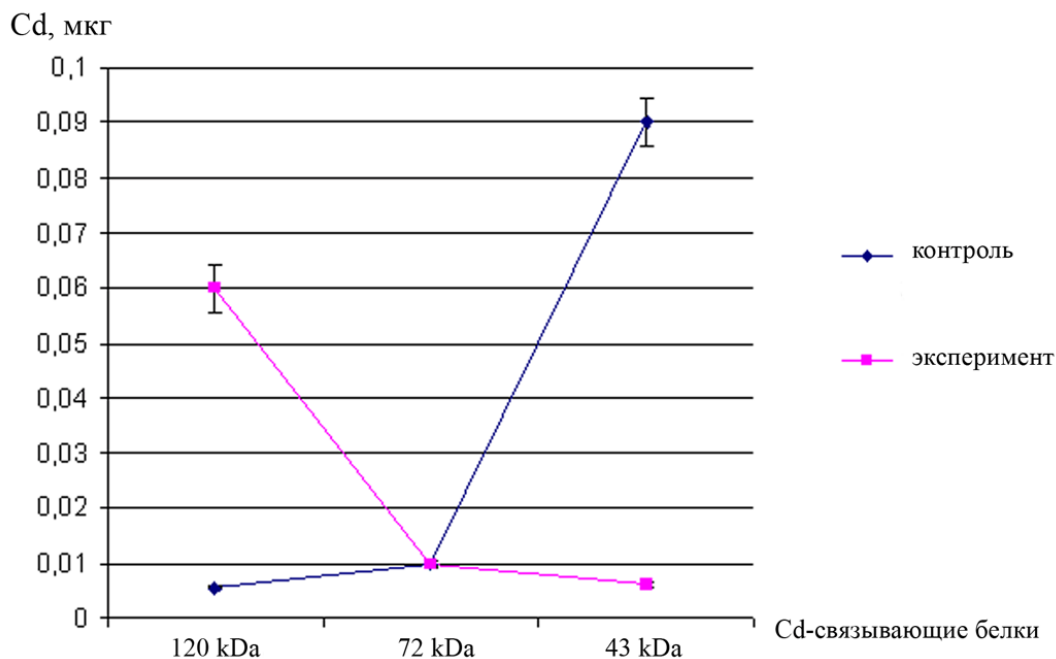


Рис. 4. Распределение кадмия среди кадмий-связывающих белков пищеварительной железы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

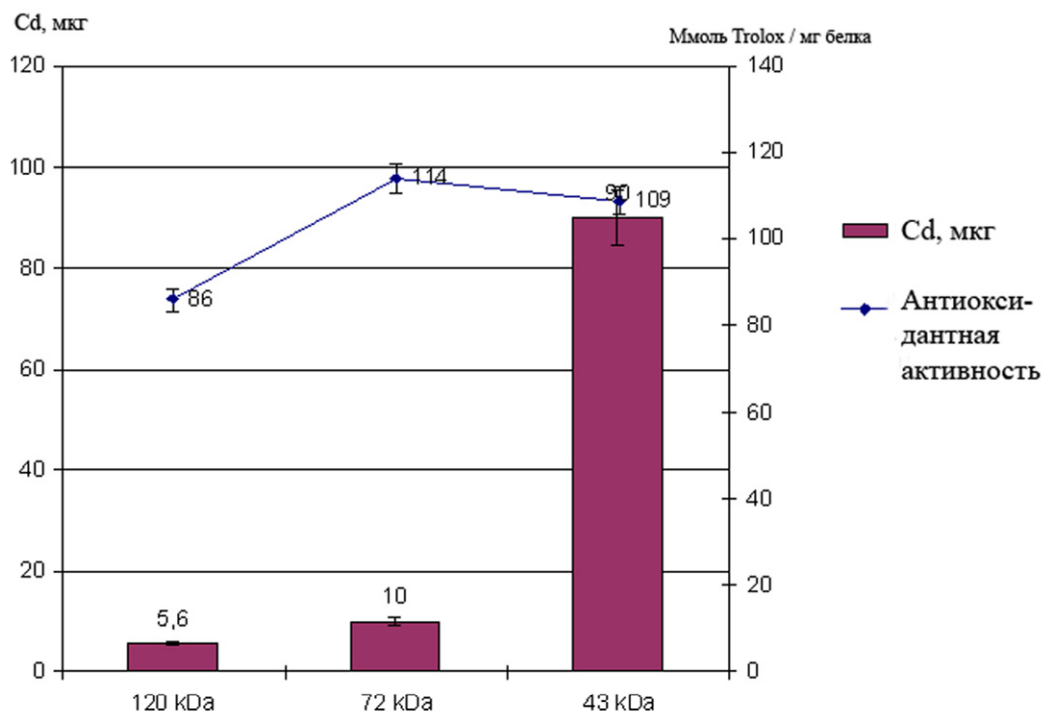


Рис. 5. Корреляция между содержанием кадмия и антиоксидантной активностью в кадмий-связывающих белках пищеварительной железы контрольной группы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

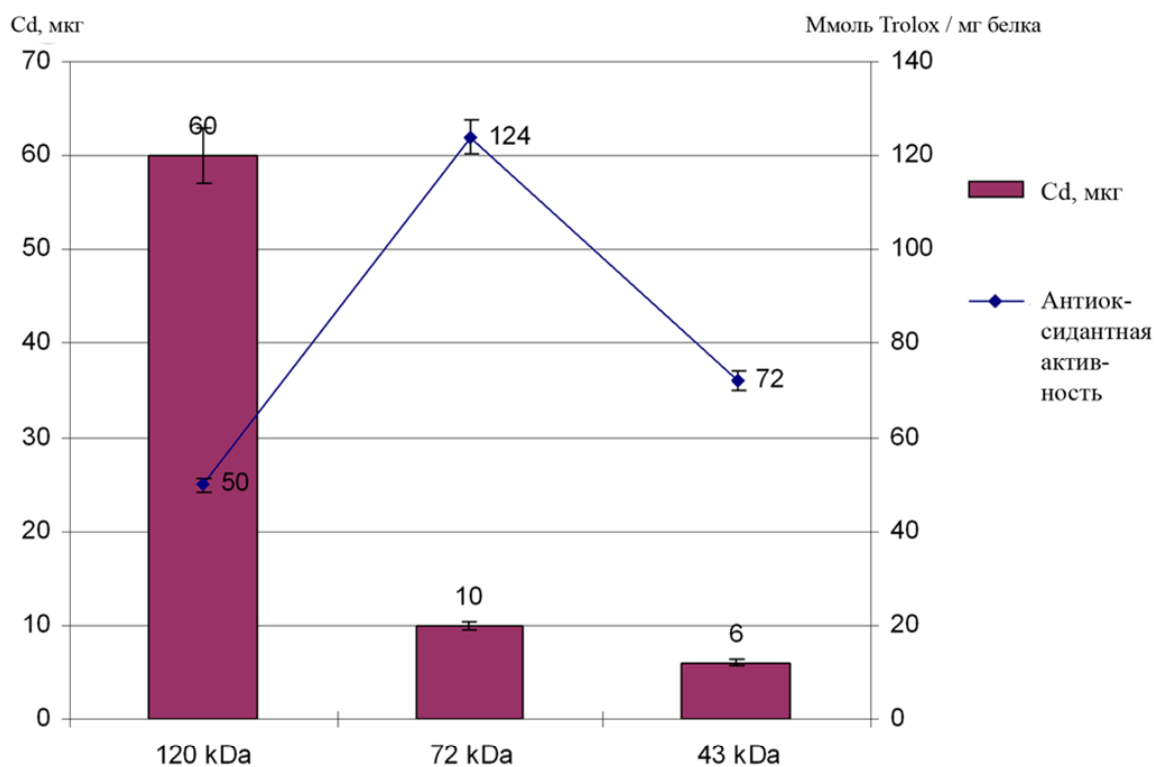


Рис. 6. Корреляция между содержанием кадмия и антиоксидантной активностью в кадмий-связывающих белках пищеварительной железы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, после обработки кадмием ( $CdCl_2$ , 300 мкг/л)

Из рисунков 5 и 6 видно так же, что эксперимент по содержанию приморского гребешка *M. yessoensis* в среде с повышенной концентрацией кадмия (300 мкг / л) обнаружил, что годовалые особи этого вида уже имеют хорошо развитую систему адаптации к этому токсичному металлу. Однако в ответ на чрезвычайно высокие концентрации кадмия, обнаруженные металлсвязывающие белки теряют показатели АО активности в среднем на 20–30 единиц.

### Обсуждение

В работе впервые исследована способность возрастной группы 1<sup>+</sup> приморского гребешка *M. yessoensis* к аккумуляции кадмия в естественных и лабораторных условиях. Результаты данного исследования продемонстрировали, что годовалые особи приморского гребешка *M. yessoensis* способны накапливать в пищеварительной железе токсичный кадмий вне зависимости от условий эксперимента. Кроме того, повышенное содержание кадмия в окружающей среде вызывает интенсивное накопление этого металла в клетках пищеварительной железы гребешков без видимого патологического эффекта. На данном представителе сем Pectinidae ранее Челомин с соавторами (Chelomin et al., 1995) исследовали способность половозрелых особей приморского гребешка к аккумуляции кадмия и показали, что взрослые особи способны накапливать кадмий, главным образом, в почках и пищеварительной железе (100 мкг Cd / г сухого веса в контроле и 700 мкг Cd / г сухого веса на 14 день эксперимента). Так же этими авторами было показано, что аккумуляция кадмия вызывает перераспределение меди, цинка и железа в пищеварительной железе. Таким образом, можно предположить, что в процессы накопления и детоксикации кадмия вовлекаются жизненно-важные микроэлементы, особенно цинк и медь. Это предположение находит подтверждение в дальнейшем исследовании молекулярных механизмов, участвующих у приморского гребешка *M. yessoensis* в аккумуляции этого токсичного металла (Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Chelomin V. P., 2008).

В данном исследовании идентифицированы три высокомолекулярных, термостабильных, устойчивых к органическим растворителям белковых компонента в пищеварительной железе годовалых особей приморского гребешка, участвующих в связывании кадмия (120 кДа, 72 кДа и 43 кДа). В настоящий момент известно, что та-

кие свойства как термостабильность и устойчивость к органическим растворителям характерны для белков – металлотионеинам (МТ) и МТ-подобным белкам, которым принадлежит ведущая роль в связывании высокотоксичных металлов, в том числе и кадмия. Эти специфические белки обнаружены во многих представителях морских беспозвоночных (Jin-Shung Park et al., 2002; Dallinger et al., 1993; Giguere et al., 2003). Так в клетках пищеварительной железы *Pecten maximus*, основная роль в связывании и детоксикации Cd принадлежит высокомолекулярным белкам (Stone et al., 1986). Авторам удалось показать, что кадмий в пищеварительной железе *P. maximus* распределяется между тремя цитоплазматическими компонентами – 150 кДа, 55 кДа и 10 кДа. В северо-атлантическом представителе семейства Pectinidae *Adamussium colbecki* (Ponzano, 2001) был обнаружен в пищеварительной железе кадмий-связывающий низкомолекулярный белок (10 кДа). Все это свидетельствует о хорошо развитых и высоко вариабельных механизмах адаптации к высокотоксичному кадмию у представителей этого семейства.

Известно, что в ответ на действие прооксидантов организм реагирует каскадом реакций – антиоксидантным ответом. Одним из вариантов антиоксидантной защиты организма в ответ на стресс различной природы в организме морских беспозвоночных повышается уровень МТ (Viarnго et al., 1988; Zapata-Vivenes E., and Nusetti O., 2007). Поэтому эти белки нередко используются исследователями в качестве биомаркеров специфического стресса.

В нашем исследовании была выявлена и оценена способность Cd-связывающих белков проявлять свойства антиоксиданта в организме приморского гребешка в ответ на поступление в организм кадмия. Подобные исследования были выполнены Виаренго с коллегами (Viarnго et al., 1999), где авторы показали, что в мидии *Mytilus galloprovincialis* аккумуляции кадмий связывается с МТ, которые при нетоксичной дозе Cd обладают свойствами антиоксиданта. Так же, в *Mytilus galloprovincialis* Камю с соавторами (Camus et al., 2004) исследовали суммарный антиоксидантный потенциал (TOSC – Total Oxуradical Scavenger Capacity) у мидий, пересаженных из экологически чистого района в акваторию Веницианского залива, испытывающего на себе антропогенную нагрузку. Авторы не выделяли индивидуальные металлсвязывающие белки, тем не менее, на общей цитозольной фракции клеток пищеварительной железы

*M. galloprovincialis* они показали, что уровень антиоксидантного потенциала (TOSC) возрастает и достигает максимума после двухнедельного пребывания мидий в загрязненной акватории.

В нашей работе исследование общей антирадикальной активности Cd-связывающих белков пищеварительной железы приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, показало, что иссле-

дуемые белки способны поглощать кислородные радикалы, а, следовательно, являются одним из механизмов антиоксидантной защиты в приморском гребешке. Снижение уровня TOSC исследуемых металлсвязывающих белков у неполовозрелого гребешка можно рассматривать как механизм адаптации к условиям изменяющейся окружающей среды.

## Литература

Bustamante P., Miramand P. Interspecific and geographical variations of trace element concentrations in Pectinidae from European waters // *Chemosphere*. 2004. Vol. 57. P. 1355–1362.

Camus L., Pampanin Daniela M., Volpato E., Delaney E. Sanni S., Nasci C. Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities // *Mar. Poll. Bull.* 2004. Vol. 49. P. 801–808.

Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N. and Chekmasova N. M. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 110C. No. 3. P. 9–12.

Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Birchler N., Hauer C. R. and Jeremias H. R. Kagi. Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 216. P. 739–746.

Giguere A., Coulliard Y., Campbell P. G.C., et al. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient // *Aquatic Toxicology*. Vol. 64. 2003. P. 185–200.

Jin-Sung Park, Soohye Chung, Il-Seon Park, Yangsun Kim, Chul-Hwan Koh, In-Sook Lee. Purification and characterization of metallothionein-like cadmium-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2002. Vol. 131. P. 425–431.

Julshamn K., Andersen K.-J. Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed mollusks in western Norway-I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1983a. Vol. 75A. P. 9–12.

Kagi J. H. R. and Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein // *Experientia Suppl.* 1987. Vol. 52. P. 25–61.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

Mauri M., Orlando E., Nigro M., Regoli F. Heavy metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Mar. Ecol. Prog.* 1990. Vol. 67. P. 27–33.

Muller T., Schuckelt R. and Jaenicke L. Evidence for Radical Species as Intermediates in cadmium/Zinc – Metallothionein – dependent DNA Damage *IN VITRO* // *Environmental Health Perspective*. 1994. Vol. 102. Supplement 3. P. 27–29.

Ramana Kumari M. V., Hiramatsu M. and Ebadi M. Free radical Scavenger Actions of Metallothionein Isoforms I and II // *Free Rad. Res.* 1998. Vol. 29. P. 93–101.

Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Proteggente Anna, Pannala Ananth, Yang Min, and Rice-Evans Cathrine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. Vol. 26. Nos. 9/10. P. 1231–1237.

Roesijadi G., Fowler B. A. Purification of invertebrate metallothioneins // *Methods in Enzymology*. 1991. Vol. 205. P. 263–273.

Stone H. C., Wilson S. B and Overnell J. Cadmium-binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization // *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 85C. No. 2. P. 259–268.

Viarengo A., Palmero S., Zanicci G., Capelli R., Vaissiere R. and Orunesu M. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* // *Mar. Env. Res.* 1985. Vol. 16. P. 23–36.

Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E. and Blasco J. Role of metallothionein against oxidative stress in mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 227. P. 1612–1619.

Viarengo A., Canesi L., Massu-Cotelli A., Ponzano E., Orunesu M. Cu, Zn, Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902): role of metallothionein in the homeostasis and in the detoxification of heavy metals // *Mar. Env. Res.* 1993. Vol. 35. P. 216–217.

Zapata-Vivenes E., and Nusetti O. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis* // *Journal of Shellfish Research*. August 1. 2007.

Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Chelomin V. P. Adaptation biochemical mechanisms to cadmium in the far eastern scallop *Mizuhopecten yessoensis* / *Physiomer* 08: abstr. 2008. Brest. France. 1–4 September. P. 86.

Никаноров А. М., Жулидов А. В., Покаржевский А. Д. Биомониторинг тяжелых металлов в пресных экосистемах // Л.: Гидрометеиздат, 1985. 144 с.

## ASSESSMENT OF FEATURES IN BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION OF YOUNG GROWTH SCALLOP *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

A.F. Zhukovskaya, V.P. Chelomin

*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute of Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia,*

e-mail: avianna@poi.dvo.ru

A feature biochemical mechanism of cadmium adaptation was studied in age-1<sup>+</sup> scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia). Total cadmium was found to be associated with three high molecular weight MT-like proteins. A novel cadmium-binding protein was revealed in digestive gland of age-1<sup>+</sup> scallop *M. yessoensis*. In present time this new high molecular weight (120 kDa) protein has not been detected in adult (5–7 ages). The existence of two proteins 43 and 72 kDa molecular weight cadmium-

binding proteins also was founded. Total oxyradical scavenger capacity (TOSC) was investigated for cadmium-binding proteins identified in digestive gland of *M. yessoensis*. The means of TOSC were compared between control and experimental groups (CdCl<sub>2</sub> 300 mcg/l) of scallops *M. yessoensis*. The putative biological significance of the features in biochemical mechanism of cadmium adaptation in young growth scallops *Mizuhopecten yessoensis* is discussed.