

На правах рукописи



БОНДАРЕВА Людмила Александровна

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ
НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ
У ГИДРОБИОНТОВ**

Специальность 03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск
2004

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии
Института биологии Карельского научного центра
Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
НЕМОВА Нина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ВАЛУЕВА Татьяна Александровна

доктор биологических наук
ОЛЕЙНИК Виктор Михайлович

Ведущее учреждение: Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится "30" сентября 2004 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском Государственном педагогическом университете по адресу: 185035 Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан " _____ " _____ 2004 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета



Малкиель А.И.

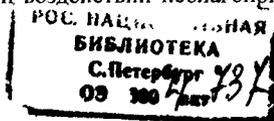
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Выяснение биохимических механизмов развития адаптивных реакций у животных является важным аспектом решения одной из фундаментальных проблем биологии – взаимодействия организма и среды. Особый интерес представляет изучение биохимических адаптаций у водных организмов (беспозвоночных и рыб), являющихся пойкилотермными животными, у которых легче, чем у теплокровных, установить взаимосвязь со средой, так как у них эта система в большей степени открыта. Результаты таких исследований могут иметь несомненное значение для выяснения как специфических, так и общих механизмов развития адаптационного процесса. В современных условиях состояние организмов в природных водоемах в значительной степени зависит от степени антропогенной нагрузки, которое зачастую усугубляется естественными абиотическими и биотическими факторами. Водоемы Карелии, расположенные в зоне северной тайги, отличаются от более южных водных экосистем повышенной чувствительностью и низкой устойчивостью к антропогенному загрязнению (Заличева и др., 2002; Моисеенко, 2003). Известно, что действие на организм факторов среды сопровождается вовлечением различных механизмов регуляции гомеостаза. Среди них важное место занимает протеолиз, являющийся прерогативой выживания организмов. Протеолитические ферменты действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки, и поэтому их роль в механизмах биохимических адаптаций невозможно переоценить (Антонов, 1983; Локшина, 1986; Мосолов, 1988; Немова, 1996; Barrett, 1977; Bohley, 1987). При действии экстремальных факторов повышается активность внутриклеточных протеиназ, образуются биологически активные вещества, которые в последующем влияют на синтез белка и нуклеиновых кислот. Так индуцируются структурные перестройки, характерные для долговременной адаптации, что, по-видимому, является проявлением общего адаптационного синдрома. Нарушение регуляции и нормального функционирования протеолитических ферментов приводит к развитию патологических состояний.

Цель настоящей работы состояла в выяснении особенностей функционирования системы внутриклеточных протеолитических ферментов у гидробионтов, выявлении приспособительных ответных реакций на уровне протеолиза у водных организмов, принадлежащих к разным таксонам, при воздействии на них факторов среды различной природы, в том числе антропогенных.

В задачи исследований входило:

1. охарактеризовать в сравнительном аспекте основные ферменты системы внутриклеточного протеолиза (лизосомальные и кальцийактивируемые протеиназы цитозоля) у гидробионтов - представителей различных таксонов, включая ракообразных, моллюсков и костистых рыб;
2. изучить уровень активности и свойства протеиназ в органах рыб, различающихся особенностями биологии;
3. в натуральных и аквариальных экспериментах изучить ответные реакции различных таксономических групп гидробионтов на действие наиболее характерных для водоемов Северо-Запада России факторов, включая антропогенное загрязнение;
4. провести сравнительный анализ состояния системы протеолиза в тканях гидробионтов, обитающих в акваториях с разным уровнем антропогенной нагрузки;
5. на основании анализа полученных данных выяснить возможность использования показателей внутриклеточного протеолиза в качестве биотестов при оценке качества сред обитания гидробионтов, их физиологического состояния и адаптивных возможностей при воздействии неблагоприятных факторов среды.



Научная новизна работы. Большая часть представленных в настоящей работе данных о протеолитических ферментах рыб и морских беспозвоночных получена впервые. Впервые выделены и изучены свойства кальций-зависимых протеиназ у ряда ранее не исследованных в этом отношении объектов. Показано, что под влиянием изменяющихся факторов среды внутриклеточные протеиназы вовлекаются в адаптивные или патологические перестройки в клетках в зависимости от силы и длительности воздействия фактора, резистентности организма, половой принадлежности, тканевой специфичности. Таким образом, научная новизна работы состоит в установлении общих и специфических черт ответных реакций различных таксономических групп гидробионтов на уровне внутриклеточного катаболизма белков на действие переменных факторов водной среды, естественных и антропогенных.

Практическая значимость работы. Работа является частью многолетних исследований, проводимых в лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН в рамках основных направлений биологических наук РАН (5.15, 5.21), грантов РФФИ №98-04-48482а, №02-04-48451, №03-04-06351мас, ФЦП "Интеграция" №641, №3 3010/2354, грантов Санкт-Петербургского конкурса для молодых ученых (№М 01-2.6К-714, №М03-2.6 К-588), Санкт-Президента РФ "Ведущие научные школы" (НШ-894.2003.4). Исследуемые показатели белкового катаболизма (уровень активности лизосомальных катепсинов В и D, молекулярных форм кальпаинов цитозоля) могут быть использованы в качестве дополнительных биохимических критериев при разработке системы эколого-биохимического мониторинга водосмов и для оценки физиолого-биохимического состояния организмов. Результаты, полученные в ходе исследований, могут послужить основой для более углубленного изучения сравнительно-эволюционных и физиолого-биохимических аспектов протеолиза у животных. Материалы диссертации используются в лекционных курсах "Экологическая биохимия" и "Введение в энзимологию" для студентов ПетрГУ и КГПУ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на V conference "Ichthyohaematology" (Protivin, Czech Republic, 1998), V international conference "Mercury as a global pollutant" (Rio de Janeiro, Brasil, 1999), 3rd international Lake Ladoga symposium "Monitoring and sustainable management of Lake Ladoga and other large lakes" (Petrozavodsk, 1999), международной конференции "Биологические основы изучения, освоения и охраны жив. и раст. мира, почв, покрова Восточной Фенноскандии" (Петрозаводск, 1999), международной конференции "Атлантический лосось *Salmo Salar*: биология, запасы, воспроизводство" (Петрозаводск, 2000), IX Всероссийской конф. "Экологическая физиология и биохимия рыб" (Ярославль, 2000), VIth European symposium on calcium binding proteins in normal and transformed cells (Paris, France, 2000), международной конференции "Биокатализ 2000" (Москва, 2000), XX-XXI Workshops "Biological essentiality of trace and ultratrace elements" (Jena, Germany, 2000, 2002), международной конференции "Экологическая физиология и биохимия рыб" (Ярославль, 2000), конференции "Поморье в Баренц Регионе: Экономика, экология, культура" (Архангельск, 2000), III-IV international symposia "Micro and trace elements in human: new perspectives" (Athens, Greece, 2001, 2003), конференции "Экологические проблемы онтогенеза рыб (физиолого-биохимические аспекты)" (Москва, 2001), конференции "Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга" (Сыктывкар, 2001), V симпозиуме по химии протеолитических ферментов (Москва, 2002), III съезде биохимического общества России (Санкт-Петербург, 2002), конференции "Современные проблемы водной токсикологии" (Борок, 2002), XIth symposium on trace elements in man and animals (Berkeley, USA, 2002), международном семинаре "Современные проблемы физиологии и экологии морских животных (рыбы, птицы, млекопитающие)" (Ростов-на-Дону, 2002), II AMAP symposium on environmental pollution of the Arctic (Rovaniemi, Finland, 2002), IIIrd young scientists conference "XXI century: ecological science in Armenia" (Yerevan, 2002), IInd international conference on enzymes in the environment: activity, ecology and applications (Praha, Czech Republic, 2003), 9th meeting of PhD students in evolutionary biology (Fiesch, Switzerland, 2003), конференции "Экологические

проблемы бассейнов крупных рек - 3" (Тольятти, 2003), международной конференции "Инновации в науке и образовании-2003" (Калининград, 2003), 10th meeting of PhD students in evolutionary biology (Shrewsbury, Great Britain, 2004).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаб. экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН (особенно с.н.с. Е.И. Кяйвярайнен и с.н.с. М.Ю. Крупновой), кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ПетрГУ, ББС ЗИН РАН "Картеш", ИБВВ РАН (пос. Борок Ярославской обл.), Кандалякского государственного природного заповедника (Мурманская обл.), ИВПС КарНЦ РАН за помощь в получении биологического материала, в постановке экспериментов и обсуждении результатов исследований.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 37 работ, в том числе 12 статей и 25 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, четырех глав результатов исследования, заключения, выводов, списка литературы и приложения. В работе имеется 44 таблицы, 42 рисунка. Список литературы включает 361 источник, из них 116 на русском и 245 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приведены современные представления о структуре, свойствах, механизмах регуляции и биологической роли внутриклеточных протеолитических ферментов у животных, в том числе у рыб и водных беспозвоночных. Охарактеризовано воздействие на водные организмы важнейших абиотических факторов водной среды, варьирование которых наиболее типично для малых водоемов Северо-Запада России и прибрежной акватории Белого моря. Анализируются уже имеющиеся данные о механизмах клеточных и молекулярных перестроек у водных организмов в условиях изменения исследуемых факторов среды. Рассматривается вопрос об использовании водных организмов в качестве объектов экотоксикологии, биоиндикации и мониторинга.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал

Эксперименты по теме диссертации проводились в 1997-2003 гг. в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского НЦ РАН. Материал для отдельных исследований был получен при содействии кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ПетрГУ, лаборатории физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод РАН (пос. Борок), Кандалякского государственного природного заповедника (Мурманская обл.), ББС ЗИН РАН "Картеш", ИВПС КарНЦ РАН.

Объектами исследований служили представители различных таксонов гидробионтов: костистых рыб, двусторчатых моллюсков, ракообразных - обитателей морей и континентальных пресных водоемов Севера России. В экспериментах использовали пресноводных рыб сем. *Esocidae* (щука *Esox lucius* L.), сем. *Cyprinidae* (плотва *Rutilus rutilus* L., карась *Carassius carassius*), сем. *Percidae* (окунь *Perca fluviatilis*), выловленных в водоемах Республики Карелия и Вологодской области, морских рыб сем. *Gadidae* (навага *Eleginus navaga* Pall.), сем. *Salmonidae* (атлантический лосось *Salmo salar* L., форель *Salmo trutta* L.) и беспозвоночных бассейна Белого моря: двусторчатых моллюсков сем. *Mytilidae* (мидий *Mytilus edulis* L.) и ракообразных амфипод рода *Gammaridae*.

В качестве материала исследований использовали различные органы и ткани рыб (белые мышцы, печень, гонады, жабры, селезенка, почки, в некоторых экспериментах

- кровь), гомогенаты цельных организмов мидий и амфипод, печень, почки, мышцы крыс. После препарирования органы исследуемых водных организмов отмывали охлажденным 0.9% раствором NaCl и хранили биологические образцы в состоянии глубокой заморозки при -25°C до начала анализа. Часть материала использовалась для определения содержания некоторых неорганических элементов в соответствии с целями эксперимента.

Выделение и частичная очистка исследуемых протеиназ

Очистка протеиназ из тканей рыб и цельных гомогенатов амфипод и мидий включала общепринятые этапы с использованием различных физико-химических методов выделения белков. Гомогенизацию тканей и экстракцию белков проводили в течение 3 мин. при охлаждении ($+4^{\circ}\text{C}$), используя гомогенизатор типа Поттера-Эльвейса с тefлоновым лестиком. Готовили 10%-ные гомогенаты ткани в 0.1 М ацетатном буфере (pH 5.0 для катепсина В, pH 3.6 для катепсина D), содержащем 0.25 М сахарозы и 0.1% тритона X-100 для разрушения клеточных структур и выделения фракции лизосом. Для выделения кальпаинов готовили 25%-ные гомогенаты тканей в буфере А (10 мМ трис-HCl, 50 мМ NaCl, 4 мМ EDTA, 5 мМ меркаптоэтанол), содержащем 0.25 М сахарозы (pH 7.5). Дифференциальное центрифугирование гомогенатов (Покровский, Тутельян, 1976) проводили при 13 тыс. g x 30 мин. (центрифуга K-24). Результирующий супернатант использовали в качестве первичного источника лизосомальных протеиназ. Цитозольную фракцию получали при 105 тыс. g x 30 мин., в ней определяли активность кальций-зависимых протеиназ. Диализ и ионообменную хромаатографию проводили на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой (5x30 см) (Дэвени, Гергей, 1976). Элюцию ферментов проводили с помощью непрерывного градиента р-ра NaCl (0.1-0.4 М). Фракции, содержащие кальцийактивируемую протеолитическую активность, собирали. концентрировали на ПЭГ-10 000 и использовали для дальнейшей очистки. Гель-фильтрационное разделение молекулярных форм кальпаинов и отделение белкового ингибитора - кальпастина проводили на колонках (2.5x95 см) с ультрагелем AcA34 (Sigma) или Sephacryl S200 (Pharmacia), уравновешенными буфером А. Элюцию проводили со скоростью 24 мл/ч буфером А, собирали фракции элюента объемом 4 мл.

Определение молекулярной массы исследуемых белков вели описанным ранее методом гель-фильтрации на ультрагеле AcA34 или Sephacryl S200 с помощью калибровочного графика, построенного по результатам пропускания через колонку белков с известной молекулярной массой. В качестве маркеров использовали: иммуноглобулин G (110 кДа), БСА (67.5 кДа), трипсин (34.0 кДа), цитохром С (12.6 кДа).

Электрофоретическое определение степени очистки ферментного препарата проводили на приборе фирмы "Реанал" по стандартной методике (Маурер, 1971). Полиакриламидный гель (концентрирующий - 2.5%, разделяющий - 7.5%) готовили в стеклянных трубочках 5x60 мм. После проведения электрофореза гели, извлеченные из трубочек, окрашивали 0.002% Coomassie brilliant blue R-250 в 12% ТХУ.

Определение активности протеиназ

Активность катепсина В определяли по расщеплению 0.065 М раствора этилового эфира гидрохлорида N-бензоил L-аргинина (эстеразная активность) в 0.1 М ацетатном буфере (pH 5.0) (Matsuda, Misaka, 1974), а катепсина D - по гидролизу 1% р-ра бычьего гемоглобина в 0.1 М ацетатном буфере (pH 3.6) согласно модифицированному методу Ансона (Алексеевко, 1968). Активность катепсина В и D выражали в единицах изменения оптического поглощения (E_{525} и E_{280} , соответственно) на 1 г сырой массы ткани за 1 ч инкубации (37°C).

Активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ цитозоля (кальпаинов) определяли стандартным методом по гидролизу 0.4% р-ра казеина (Mugachi, 1981) в 50 мМ имидазол-HCl буфере (pH 7.5), содержащем 5 мМ дитиотригтола в каждой фракции элюента. Инкубация опытных проб (30 мин при 30°C) происходила в присутствии 3.0 мМ CaCl_2 ; в контрольные пробы

кальций добавляли после инкубации. Концентрацию кислоторастворимых продуктов гидролиза определяли спектрофотометрически (E_{280}). Единица активности кальпаинов определялась как количество фермента во фракции, приводящее к увеличению на 1.0 оптического поглощения (E_{280}) за 1 час инкубации (30 °С).

Количественное содержание водорастворимого белка в тканях (мг/мл центрифугата) определяли спектрофотометрически (E_{595}) по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Статистическая обработка данных

Результаты исследований обработаны статистически с применением непараметрического критерия различий U (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) (Гублер, Генкин, 1969). Различия между выборками считали достоверными при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Частичная очистка, распределение, видо-, тканеспецифичность и некоторые физико-химические свойства Ca^{2+} -активируемых нейтральных протеиназ гидробионтов

Следует отметить, что механизмы Ca^{2+} -активируемого протеолиза теплокровных животных достаточно хорошо освещены в литературе (Kawashima et al., 1986; Melloni et al., 1992), хотя и в этой области остается ряд нерешенных проблем. Имеющиеся в литературе сведения о кальпаинах рыб в основном касаются их молекулярной структуры и механизмах регуляции (Toyohara, Makinodan, 1989; Wang et al., 1992); сведения о Ca^{2+} -активируемых протеиназах беспозвоночных фрагментарны (Maeda et al., 1992; Beyette et al., 1993). Недостаточно сведений о роли кальпаинов в метаболизме гидробионтов, в то время как такие исследования представляют несомненный интерес в эволюционном и экологическом аспектах.

В представленной главе приводятся результаты изучения физико-химических свойств Ca^{2+} -активируемых протеиназ представителей морских беспозвоночных класса ракообразных амфипод *Gammaridae* и кальпаинов из эритроцитов форели *Salmo trutta* L. Очистка Ca^{2+} -активируемых протеиназ рыб, цельных гомогенатов амфипод (*Gammaridae*) и эритроцитов форели (*Salmo trutta* L) включала общепринятые этапы с использованием различных физико-химических методов выделения белков. Также продемонстрирована ткане- и видоспецифичность кальпаинов рыб на примере плотвы *Rutilus rutilus* и щуки *Esox lucius*.

3.1. Активность и тканеспецифичность кальпаинов рыб и водных беспозвоночных

Кальцийактивируемые протеолитические ферменты (кальпаины) обычно представлены в тканях позвоночных животных двумя молекулярными формами, различающимися чувствительностью к Ca^{2+} . Кроме различного родства к активатору - ионам кальция, критерием распознавания форм кальпаина может служить значение молекулярной массы (Suzuki et al., 1987) и термостабильность при 58 °С (Murachi, 1981). В исходном гомогенате активность кальпаинов не регистрируется из-за присутствия эндогенного ингибитора - кальпастина (Mr~130 кДа), присутствующего в питозоле (Murachi et al., 1983; Suzuki et al., 1988).

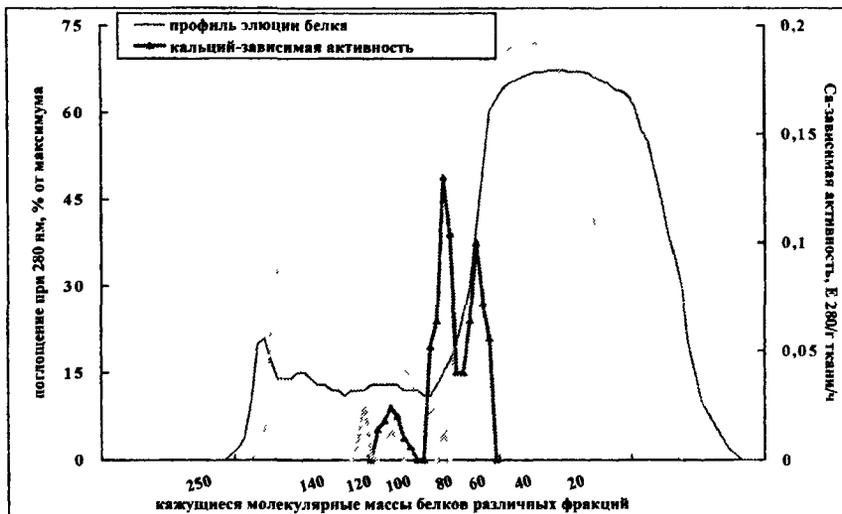


Рис. 1. Профиль элюции водорастворимых белков гомогената амфипод *Gammaridae* (—) и мышц плотвы *Rutilus rutilus* (---) после гель-хроматографии на колонках (25 × 95 см) с Sephacryl S200 и уровень Ca^{2+} -зависимой активности ($E_{280}/\text{г ткани/ч}$)

Белки после гель-хроматографии во всех случаях разделяются по молекулярной массе на три пика: наиболее высокомолекулярные белки составляют первый пик (M_r 400-110 кДа), белки с M_r в пределах 110-10 кДа - второй и третий пик включает низкомолекулярные вещества белковой природы, пептиды (рис. 1). M_r индивидуальных белков устанавливали по пропусканию через колонку белков с известными молекулярными массами. Картина соотношения веществ белковой природы, обладающих различными молекулярными массами, а также уровень активности Ca^{2+} -активируемых протеиназ тканеспецифичны. Для мышц, в сравнении с другими органами, характерно наиболее низкое содержание высокомолекулярных белков. Подобное соотношение пиков наблюдается также на хроматограмме амфипод. Количественное содержание белка, определенное методом Брэдфорд (Bradford, 1976), в этих пробах также сравнительно низкое (особенно у амфипод). Известно (Murachi et al., 1981), что первыми с колонки элюируются фракции, в которых определяется активность более высокомолекулярного кальпаина II (mM-форма), а затем - активность кальпаина I (μM -форма). Третий пик, скорее всего, обусловлен наличием каталитически активной субъединицы кальпаинов, образовавшихся в результате автолиза высокомолекулярных форм (Suzuki et al., 1988; Beyette et al., 1993). У изученных видов рыб обнаружено наличие протеолитической активности, активируемой ионами кальция, во фракциях белкового элюента с M_r 120, 110 и 80 кДа. Ранее было показано наличие двух форм кальпаина для осетровых, лососевых и карповых рыб (Toyohara, Makinodan, 1989; Немова, 1996). Результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные, что оба фермента могут присутствовать в ткани одновременно, однако их относительное содержание варьирует в широких пределах (Murachi et al., 1981; Suzuki et al., 1988). Сравнительные величины активности Ca^{2+} -активируемого протеолиза в органах объектов приводятся в диссертации. При рассмотрении полученных результатов изучения Ca^{2+} -активируемых протеиназ амфипод и литературных данных для кальпаинов млекопитающих и рыб (Dayton et al., 1976; Toyohara, Makinodan, 1989; Melloni et al., 1992; Немова, 1996) следует

отметить, что если уровень активности кальпаинов у рыб и млекопитающих весьма сходен, то у беспозвоночных он на порядок выше. По-видимому, это является отражением эволюционной древности и примитивности организации, а также особенностями среды обитания беспозвоночных холодных морей. Протеолитические ферменты водных беспозвоночных, являясь эволюционными предшественниками протиназ высших животных, обладают, как правило, и более широкой субстратной специфичностью (Мухин и др., 1998). У щуки активность кальпаинов выше, чем у плотвы, что может быть связано с видовыми особенностями (двигательной активностью и кормовой преференцией).

Большая часть исследований, касающихся Ca^{2+} -активируемых протеиназ у рыб и водных беспозвоночных, проведены на мышечной ткани (Jeng et al., 1993; Maeda et al., 1992b; Beyette et al., 1993), как известно, богатой кальцием. По-видимому, функция кальпаинов в мышечной ткани связана с участием в деградации миофибриллярного аппарата: *in vitro* кальпаины инициируют гидролиз миофибриллярных белков, включая Н-цепь миозина, С-белок, тропомиозин, тропонины Т и I, белки промежуточных филаментов десмин и виментин (Локшина, 1986; Dayton et al., 1975; Waxman, 1978). Более высокая активность кальпаинов в жабрах щуки по сравнению с плотвой объясняется, по-видимому, большей потребностью в кислороде и, соответственно, большей эффективностью дыхательной функции у активных рыб, чем у малоподвижных (Hughes, 1966). Поскольку у быстроплавающих рыб расходование белков происходит интенсивнее, активность протеолитических ферментов у них выше и процессы аутолиза у таких видов протекают быстрее (Bailey, 1942).

3.2. Свойства Ca^{2+} -зависимых протеиназ из гомогенатов амфинод *Gammaridae*

Ca^{2+} -зависимая активность у амфинод элюируется в трех пиках с молекулярными массами 110, 80 и 65 кДа (рис. 1). Дальнейшее изучение таких свойств различных фракций, как температурная устойчивость, чувствительность к Ca^{2+} (рис. 2а), рН-зависимость (рис. 2б), чувствительность к действию ингибиторов, позволило идентифицировать выделенные ферменты как кальпаин-подобные ферменты беспозвоночных. Известно, что классическое разделение кальпаинов на кальпаин I и кальпаин II не характерно для беспозвоночных: размеры их молекул очень отличаются (Mykles, Skinner, 1986; Pinter, Friedrich, 1988).

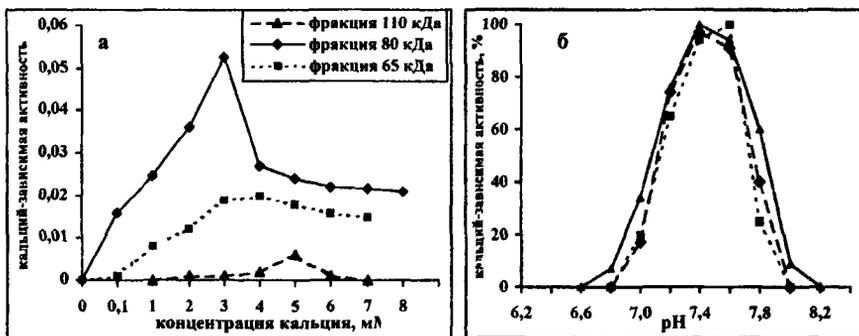


Рис. 2. Зависимость активности кальпаин-подобных протеиназ амфинод (M_r 110, 80 и 65 кДа) от (а) концентрации Ca^{2+} и (б) рН инкубационной среды

Концентрация Ca^{2+} , необходимая для проявления максимальной активности, составила 5.0 мМ для фракции М_r 110 кДа, 3.0 мМ для фракции с М_r 80 кДа и промежуточная зависимость активности от концентрации Ca^{2+} 4.0 мМ характерна для фракции с М_r 65 кДа. Следует отметить, что столь высокий уровень Ca^{2+} не физиологичен для

цитоплазмы клетки. Максимальная активность всех молекулярных форм фермента зафиксирована при pH 7.4-7.6, т.е. в нейтральной области pH, свойственной цитозолю.

Известно, что одним из критериев распознавания кальпаинов I и II у позвоночных служит их термостабильность при 58 °С. Активность кальпаина II карпа снижается на 25% при нагревании в течение 5 минут, тогда как активность кальпаина I не изменяется (Murachi, 1981). Показано, что активность, связанная с фракцией фермента амфипод с M_r 110 кДа полностью инактивируется уже при воздействии 48 °С, протеиназа с M_r 80 кДа частично теряет активность только при 58 °С, фракция фермента 65 кДа демонстрирует промежуточную термостабильность. Полученные данные свидетельствуют о том, что кальпаин-подобные ферменты амфипод значительно более чувствительны к нагреванию, чем кальпаины рыб. Это также согласуется с данными Maeda (1992) о том, что кальпаины, выделенные из беспозвоночных, обычно менее термостабильны, чем кальпаины млекопитающих (Maeda et al., 1992).

При воздействии широкого спектра ингибиторов протеиназ показано, что Ca^{2+} -зависимые протеиназы амфипод чувствительны к действию ингибиторов, воздействующих на SH-группы цистеина: алкилирующих реагентов, соединений тяжелых металлов, а также агентов, связывающих двухвалентные ионы (например, Ca^{2+}), что позволяет отнести их к цистеиновым протеиназам. Кроме того, известно, что в цитозоле присутствие Ca^{2+} -зависимых протеиназ обязательно сопровождается присутствием их эндогенного конкурентного ингибитора - кальпастина (Suzuki, 1988), необычайно термостабильного (Maki et al., 1990). Кальпастин из амфипод элюируется с колонки Sephacryl S200 в белковой фракции с M_r ~130 кДа.

3.3. Свойства Ca^{2+} -зависимых протеиназ из эритроцитов форели *Salmo trutta* L.

Наш интерес к кальпаинам эритроцитов (рис. 3) связан как с выполняемой ими функцией в созревании и регуляции физиологических процессов, так и со своеобразием наличия и соотношения молекулярных форм кальпаина в этих клетках крови.

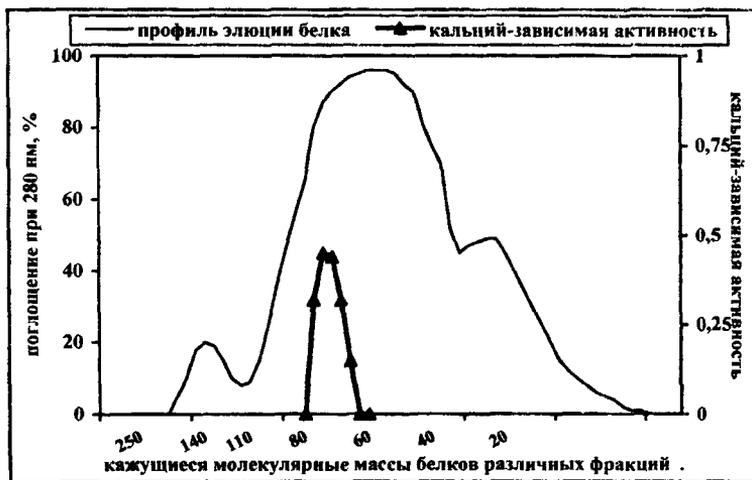


Рис. 3. Профиль элюции водорастворимых белков гемолизата эритроцитов форели после гель-хроматографии на колонках (2 5×95 см) с ультрагелем АСА 34 и уровень Ca^{2+} -зависимой активности (E_{280} /г ткани/ч)

Известно, что обычно в эритроцитах млекопитающих кальпаины представлены только кальпаином I, активируемым μM концентрациями Ca^{2+} (Murakami et al., 1981), в эритроцитах птиц представлены обе формы кальпаина (I и II), в то время как в эритроцитах карпа обнаруживается только кальпаин II, активируемый mM концентрациями Ca^{2+} (Toyohara et al., 1985b). По-видимому, в эволюционном ряду чувствительность кальпаинов к Ca^{2+} увеличивается, что может быть отражением молекулярной эволюции эритроцитарных кальпаинов среди рыб, птиц и млекопитающих наряду с сохранением их основных биологических функций.

Данные, полученные в эксперименте, свидетельствуют о том, что в эритроцитах форели присутствует цистеиновая (тиоловая) Ca^{2+} -активируемая протеиназа с молекулярной массой 70 кДа, проявляющая максимальную активность *in vitro* при pH 7.5 и концентрации Ca^{2+} 3.0 мМ. Физико-химические свойства фермента (чувствительность к Ca^{2+} , ингибиторам цистеиновых (тиоловых) протсиназ, pH-зависимость, значение молекулярной массы, температурный критерий) указывают на то, что он может быть идентифицирован как кальпаин II, что согласуется с имеющимися в литературе данными, полученными для эритроцитов карпа (Toyohara, Makinodan, 1989).

Глава 4. Влияние антропогенного загрязнения водоемов на внутриклеточный протеолиз у водных организмов

4.1. Влияние антропогенного загрязнения прибрежной акватории Белого моря на внутриклеточный протеолиз у амфипод *Gammaridae* и мидий *Mytilus edulis* L.

Исследовали влияние комплексного загрязнения на ферменты внутриклеточного протеолиза у типичных представителей макрозообентоса Беломорского побережья: ракообразных амфипод *Gammaridae* и двустворчатых моллюсков *Mytilus edulis* L., выловленных, соответственно, в 4 и 12 зонах прибрежной акватории в летний период (табл. 1). Водная биота эстуариев проявляет устойчивость к широкому диапазону температур, солености и доступности кислорода (Bulnheim, 1979; Ritz, 1980; Sheader, 1983), в связи с этим, беспозвоночные прибрежной зоны могут быть преадаптированы к жизнедеятельности в загрязненных водоемах (Jemelov, Rosenberg, 1976; Gray, 1981).

Прибрежные морские экосистемы Кандалакшского залива Белого моря подвержены трансформации вследствие значительного антропогенного загрязнения. Основные источники загрязнения - органические вещества наземного стока, тяжелые металлы, нефтяное загрязнение (Наумов, 1981). Ряд зон прибрежной акватории с наименьшей антропогенной нагрузкой могут расцениваться как условно "чистые" (мыс Турий, губа Порья) (точки 1, 2). Точки отбора проб были дифференцированы по принципу близкого расположения к: (а) эстуариям крупных рек, которые могут выступать в качестве мест повышенной аккумуляции загрязнителей среды, включая тяжелые металлы (точки 3, 4); (б) стокам гавани, обогащенным соединениями кальция и фосфора из состава апатитового концентрата (точки 5-8); (в) местам локального радиоактивного загрязнения (точки 9,10); (г) источникам нефтяного загрязнения (точки 11, 12) и/или (д) районам интенсивной промышленной активности (точка 13).

Показаны изменения в протеолитической активности лизосом у беспозвоночных, отражающие степень загрязнения акватории моря. У амфипод (табл. 1) зафиксировано снижение активности кислых протеиназ лизосом (катепсинов D, B) по мере роста загрязненности среды.

Таблица 1. Активность катепсина D, B и содержание водорастворимого белка в гомогенатах амфипод *Gammaridae* из различных по степени антропогенной нагрузки зон Белого моря (точки сбора приведены в порядке возрастания степени загрязнения)

Точки сбора амфипод		катепсин D $\Delta E_{280}/\text{г ткани}/\text{ч}$	катепсин B $\Delta E_{525}/\text{г ткани}/30$ мин	белок мг/мл
1	мыс Турий	1.3 ± 0.1	7.60 ± 0.4	2.18 ± 0.2
2	о Ряшков	1.43 ± 0.1	$11.65 \pm 0.7^*$	$1.22 \pm 0.1^*$
3	дср Лувенга	$1.97 \pm 0.2^*$	9.20 ± 0.6	1.40 ± 0.1
4	о Большой Березовый	1.20 ± 0.1	5.25 ± 0.3	$0.92 \pm 0.1^*$
5	о Еловый	1.11 ± 0.1	$4.80 \pm 0.2^*$	1.48 ± 0.1
6	о Овечий	$0.88 \pm 0.1^*$	$4.05 \pm 0.2^*$	$1.12 \pm 0.1^*$
7	о Большая Половинница	1.12 ± 0.1	6.20 ± 0.3	1.62 ± 0.1
8	о Малый	1.19 ± 0.1	5.50 ± 0.4	$1.04 \pm 0.1^*$
9	о Большой Лупчостров	$0.38 \pm 0.1^*$	$11.60 \pm 0.7^*$	1.74 ± 0.1
10	корга у о Оленьего	$0.54 \pm 0.1^*$	5.40 ± 0.3	$1.12 \pm 0.1^*$
11	о Олений, губа Коровья	0.97 ± 0.1	6.05 ± 0.4	$1.10 \pm 0.1^*$
12	"механический завод"	1.45 ± 0.1	$16.20 \pm 0.9^*$	$4.88 \pm 0.2^*$

* достоверность отклонения при $P \leq 0.05$, $n=12$

Для мидий в этих условиях (рис. 4а,б) характерна активация катепсина D (аспартильной протеиназы) и достоверное снижение активности катепсина B (цистеиновой протеиназы). В данном случае лизосомальный аппарат клетки, по-видимому, участвует не только в процессах биотрансформации ксенобиотиков, но и в адаптивной перестройке белкового обмена клетки. Об этом свидетельствуют также многочисленные результаты, полученные ранее в лаборатории экологической биохимии на рыбах при изучении действия различного рода токсикантов и их смесей, а также при патологиях, вызванных бактериальными и вирусными инфекциями (Nemova, 1991; Немова, 1987; Немова, Сидоров, 1990; Немова и др., 1994; Немова, 1996; Высоцкая, 1999). Многие загрязнители, включая металлы, аккумулируются в лизосомах, вызывают повышение проницаемости лизосомальных мембран, что ускоряет гидролиз белков и обуславливает клеточную атрофию (Lowe, Clarke, 1989). Степень лабильности мембран пропорциональна силе стресса (Moore, 1985; Nicholson, 1999a), и эта цитологическая реакция является первичным цитотоксическим.

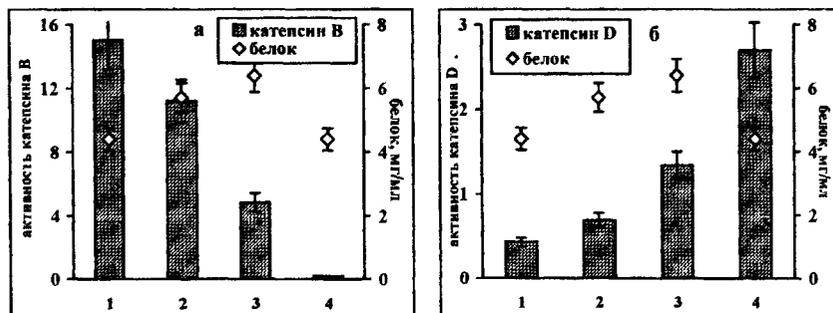


Рис. 4. Активность (а) катепсина B ($E_{525}/\text{г ткани}/30$ мин), (б) катепсина D ($E_{280}/\text{г ткани}/\text{ч}$) и содержание водорастворимого белка (мг/мл) в гомогенатах мидий *Mytilus edulis* из зон Белого моря 1 - Порья губа, 2 - о Ряшков, 3 - корга у о Телячий, 4 - о Овечий (в порядке возрастания степени загрязнения)

Как уже обрисовывалось выше, у амфипод и мидий присутствует Ca^{2+} -зависимая протеолитическая активность во фракциях белка с молекулярными массами 110, 80 и 65 кДа (рис. 1). Имеющиеся в литературе данные (Mykles, Skinner, 1990) о разнообразии биологических процессов с участием кальпаинов, а также об их высокой протеолитической способности у водных беспозвоночных (до 60% белков мышечной ткани беспозвоночных гидролизуются кальций-зависимыми протеиназами в цитозоле) позволяют предположить их участие в развитии адаптивных реакций у исследованных нами беспозвоночных Белого моря в ответ на загрязнение среды обитания.

Для беспозвоночных из загрязненных акваторий характерна активация Ca^{2+} -зависимых протеиназ. Достоверное возрастание общей Ca^{2+} -зависимой активности при этом происходит в основном за счет активации кальпаин I-подобной протеиназы (μM -формы), что указывает на повышение общего уровня обмена белков. Наблюдается лабилизация ферментных белков, что выражается в приросте субъединичной активности протеиназы. Появляется и возрастает, в соответствии со степенью загрязнения, активность более высокомолекулярного кальпаин II-подобного фермента (требующего нефизиологично высокой $\text{mM} [\text{Ca}^{2+}]$ для активации). У амфипод из зоны моря с высокой антропогенной нагрузкой ("механический завод") наблюдаются изменения в протеолизе, характерные для развития патологического процесса. Так, зафиксировано перераспределение Ca^{2+} -зависимой протеолитической активности между фракциями фермента с различным молекулярным весом (рис. 5). Ранее для позвоночных животных было показано, что экспрессия кальпаина II возрастает именно при патологических изменениях в тканях (Johnson, 1990; Немова, 1996), сопровождающихся нарушениями кальциевого гомеостаза.

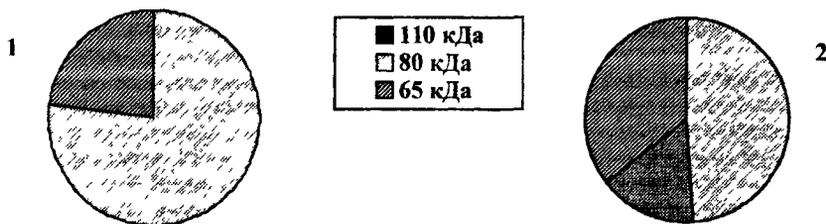


Рис. 5. Распределение Ca^{2+} -зависимой активности у амфипод *Gammaridae* между молекулярными формами кальпаина (Mг 110, 80 и 65 кДа): 1 - в порме ("чистая" зона Турин мыс) и 2 - при воздействии загрязнителей (зона "механический завод")

Характерно, что у беспозвоночных из наиболее загрязненных зон акватории на фоне высокого уровня активности протеиназ происходит накопление высокомолекулярных белков. Этот эффект показан также Порте с сотр. (Porte et al., 2001): наибольшее "истощение" низкомолекулярных соединений наблюдается в течение первой фазы воздействия поллютанта на мидий, напротив, высокомолекулярные белки значительно индуцируются при действии загрязнения. Наиболее важны не столько количественные, сколько качественные изменения состава тканевых белков. Так, для морского ракообразного *Gammarus marinogammarus olivii*, обитающего в зоне городского стока, показано снижение числа белковых фракций (Руднса, 2000).

Загрязнение в природных условиях редко обусловлено единственным веществом, а смеси загрязнителей могут оказывать и синергический, и антагонистический эффекты на биоту в зависимости от изучаемого вида (Fowler, Benayoun, 1974; Phillips, 1976; Pelgrom et al., 1994). Разграничить действие индивидуальных загрязнителей при помощи анализа состояния системы протеолиза установить сложно, для этого необходимо использовать специфические для каждого ксенобиотика биотесты.

Значительное сходство в специфике ответной реакции протеолиза у исследованных в данной работе морских беспозвоночных и ранее изученных представителей водных организмов, вероятнее всего, указывает на то, что наблюдаемые изменения в активности ферментов внутриклеточного протеолиза являются следствием неспецифической модификации белкового метаболизма клеток как части развития механизмов биохимической адаптивной реакции организмов, выработанной и закрепленной в ходе эволюции (Строганов, 1979; Немова и др., 1994).

4.2. Влияние стоков горнообогатительного комбината на внутриклеточный протеолиз некоторых пресноводных рыб

В течение ряда лет проводилось изучение протеолитических ферментов у пресноводных рыб (плотва, щука), обитающих в районе хранилища инфильтрационных вод Костомукшского горнообогатительного комбината (т.н. "хвостохранилище") и в сравнительно "чистых" малых озерах (Лувозеро, Кимасозеро, Куйто) из Кондопожского и Муезерского р-нов Карелии. Рыба из загрязненной зоны была подвержена влиянию высокоминерализованных (до 480 мг/л) техногенных стоков, характеризующихся высоким уровнем неорганических ионов: калия (до 140 мг/л), лития (до 50 мг/л), сульфатов, нитритов, а также высоким содержанием суспендированных частиц руды. Уровень тяжелых металлов в стоках ГОКа сравнительно низок вследствие сложившегося в хвостохранилище геохимического барьера: при высоких значениях pH (8.0) тяжелые металлы остаются в составе твердых фракций отходов и не поступают в водоемы (Морозов, 1998). Высказывалось предположение, что основной причиной негативного действия промышленных стоков являются ионы калия. Так, видовой ряд устойчивости пресноводных ракообразных к техногенным водам и ионам калия совпал (Пименова, 2002).

Активность естественной протеиназы катепсина В (рис. 6а), значительно ниже в органах плотвы из загрязненной зоны, чем в контроле, тогда как некоторое повышение активности наблюдалось в органах щук. Показано, что активность аспартильной протеиназы катепсина D (рис. 6б) снижается в мышцах как самцов, так и самок, этот эффект еще более выражен в печени самцов (главном органе аккумуляции, детоксикации и экскреции тяжелых металлов).

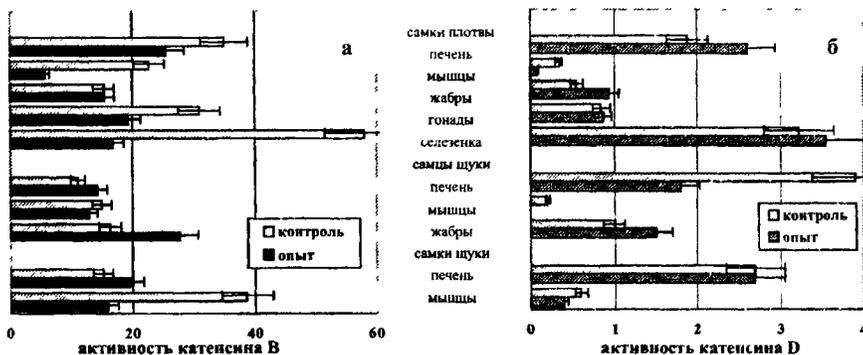


Рис. 6. Активность (а) катепсина В (E_{525} /г ткани/30 мин) и (б) катепсина D (E_{280} /г ткани/ч) в тканях плотвы *R. rutilus* и щуки *E. lucius* из оз. Куйто (контроль) и зоны, загрязненной стоками ГОКа (опыт)

Ингибирование основных протеиназ лизосом в тканях рыб может повлиять на скорость обмена тканевых белков, процессинг вновь образующихся других (отличных от протеолитических) лизосомальных гидролаз, замедлить развитие иммунного ответа, что может существенно отразиться на защитной функции лизосом (Локшина, 1979; Немова и др., 1999). Известно, что лизосомальные ферменты принимают непосредственное участие в процессах экскреции и биотрансформации низких доз ксенобиотиков, (Чекунова, Фролова, 1986).

Наряду с ингибированием лизосомальных протеиназ, наблюдалась активация кальпаинов в органах опытных рыб. Можно предположить, что это связано с регулирующей на уровне фосфолипидов мембран, некоторые из которых являются эндогенными активаторами кальпаинов. Замечено, что в условиях снижения численности видов и повышенной доступности кормовых ресурсов для выживших особей в загрязненной зоне, количество энергии, необходимой для роста организма и накопления липидов, возрастает (Adams et al., 1992, цит по: Моисеенко, 2002б). Однако в печени плотвы прирост общей активности был следствием активации кальпаина I (рис. 7а), тогда как в печени щуки - кальпаина II (рис. 7б), что указывает на развитие патологического процесса (Johnson, 1990). Кроме того, мы зафиксировали прирост субъединичной активности, являющейся следствием автолиза нативных форм фермента. Эти результаты, по-видимому, свидетельствуют о развитии адаптивных изменений в органах плотвы и патологических в органах щуки.

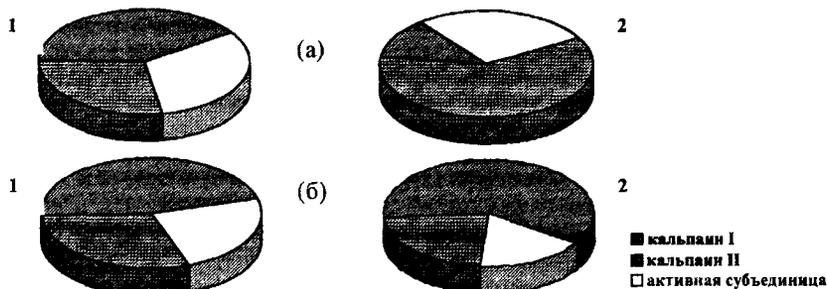


Рис. 7. Распределение молекулярных форм кальпаинов в печени самок плотвы *R. rutilus* (а) и щуки *E. lucius* (б) из "чистого" озера (1) и при воздействии сточных вод ГОКа (2)

Общее содержание белка в большинстве изученных тканей рыб из загрязненной зоны ниже, чем в соответствующих контрольных пробах.

Данные о более выраженном эффекте токсикантов на активность и свойства ферментов внутриклеточного протеолиза у тех же видов рыб, полученные ранее (Kaivarainen et al., 1998), свидетельствуют о том, что наблюдается так называемый "возврат к норме". С 2001 года технологически изменился способ подачи отработанных вод в хвостохранилище, что привело к значительному сокращению взмученности. Из литературы также известна возможность полной обратимости токсического эффекта после перевода рыб в чистую воду из растворов токсикантов в концентрациях, превышающих ПДК (Токин, Зензеров, 1977; Косинова, 1978; Руоколайнен, Высоцкая, 1983).

Следует отметить, что лабильность исследуемых параметров свидетельствует о меньшей резистентности самцов изученных видов, вплоть до полного их отсутствия в уловах. Сравнительно высока чувствительность хищных рыб, представляющих собой, как известно, завершающее звено трофической цепи.

Глава 5. Влияние соединений ртути на внутриклеточный протеолиз у водных организмов

5.1. Влияние накопления ртути и сопутствующих этому процессу факторов среды (рН, гумифицированности водоема) на протеолиз в тканях окуня *Perca fluviatilis* L. из малых озер Вологодской области и Карелии

При всей очевидности существования в России проблемы ртутного загрязнения, усиливающегося с закислением поверхностных вод, молекулярные механизмы воздействия этих факторов на биоту водоемов практически не изучены. Мелкие пресные водоемы подвержены таким изменениям в большей степени, чем крупные. Учитывая тот факт, что для проявления активности цистеинзависимых протеиназ (кальпаинов цитозоля и лизосомального катепсина В) необходимы SH-группы, чувствительные к воздействию тяжелых металлов, особенно ртути, можно полагать, что с ними связан один из возможных механизмов воздействия ртути на клеточный метаболизм, а уровень активности этих ферментов может служить дополнительным биоиндикатором ответной реакции организма рыб на этот фактор. Эти исследования имеют значение также и с точки зрения здоровья человека, так как известно, что основным источником поступления ртути в человеческий организм является рыба (Haines et al., 1994).

В представленной главе приводятся результаты исследований влияния аккумуляции ртути в мышцах рыб, обитающих в малых озерах с различной степенью acidификации (рН) и цветности (гумифицированности), на активность цистеинзависимых (тиоловых) протеиназ у окуня. Окунь *Perca fluviatilis* L. интересен как объект изучения воздействия ртути и сопутствующих факторов, поскольку является представителем хищных рыб, завершающих трофическую цепь водоема, а также он весьма устойчив к закислению среды, продолжая существовать в озерах, рН воды которых падает до уровня рН<4.0 (Комов, 1999). Кроме того, при сопоставлении одноразмерных рыб наибольший возраст и самое высокое содержание ртути в мышцах имеет окунь, а интенсивность линейного роста рыбы может рассматриваться как существенный фактор, влияющий на бионакопление ртути (Степанова, Комов, 2002).

Материал получен при сотрудничестве с лаб. физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН (Борок). Рыбу отлавливали в июне 1997 г. из озер Дарвинского государственного заповедника (Вологодская обл.), расположенных на значительном удалении от источников загрязнения. Acidные озера представлены как гумифицированными (темноводными) - Змеиное (рН 4.5; цветность 109 Hazen), Дубровское (рН 4.6; 182 Hazen), так и светловодными - Мотыкино (рН 4.8; 19 Hazen). Содержание соединений ртути в мышцах окуней из этих озер составляет соответственно 0.610, 0.597 и 0.459 мг/кг. Сопоставление гидрохимических данных изученных малых озер и аккумуляции ртути в мышцах обитающих в них окуней согласуется с имеющимися в литературе данными исследования (Haines et al., 1994) ряда бессточных нейтральных и кислых озер различной типологии, показавшими повышенный уровень ртути (0.8-1.0 мг/кг) у окуней из acidных озер с рН<5.0, что превышает ПДК и представляет угрозу здоровью людей при употреблении рыбы в пищу. Показано преимущественное отложение ртути в мышечной ткани и печени по сравнению с кишечником, жабрами и гонадами самцов. Это объясняется повышенным содержанием в макромолекулах, присутствующих в мышечной ткани, функциональных групп белков (-SH, =NH₂, -COOH, -OH), к которым ртуть проявляет высокую степень сродства, и значительной ролью печени в детоксикации соединений ртути за счет высокого содержания серосодержащих компонентов Гонады каждый год формируются заново, поэтому для них характерна меньшая степень аккумуляции токсиканта (Svobodova et al., 1999).

Выявленное снижение содержания тиоловых белковых групп, являющихся компонентами металлотионеинов (Немова и др., 2001) и исследуемых нами цистеинзависимых ферментов, можно расценивать как подавление защитных реакций на уровне

органов и систем организма. т.к. это свидетельствует об угнетении основного пути выведения тяжелых металлов - в связанном с серосодержащими лигандами состоянии с желчью (Clarkson, 1997; Urano, 1997).

Активность основной пептинозависимой протеиназы лизосом катепсина В в мышцах имеет максимальное значение в тканях рыб из озер с рН 4.5, при этом в гонадах эта активность минимальная. Специфика изменения параметра в различных органах, очевидно, обусловлена различием в уровне аккумулированной ртути. Кроме того, известно (Bose et al., 1993), что в лизосомы проникает минимальное количество ртути в сравнении с другими компартментами клетки, поэтому активацию катепсина В в тканях рыб из наиболее кислого озера можно объяснить реализацией запитной функции лизосом в процессах экскреции, а следовательно, детоксикации металлов.

Показано наличие у окуня протеолитической активности, активируемой ионами кальция, во фракциях белкового элюата с M_r 120, 110 и 80 кДа. При сравнении данных не обнаружено существенных различий между уровнем активности кальпаина II у окуней из всех трех рассматриваемых озер, однако наблюдается достоверное увеличение активности кальпаина I в мышцах окуня в соответствии с ростом рН водоемов. Кроме того, у окуней из наиболее кислого озера достоверно выше активность субъединицы кальпаинов, образование которой является следствием аутолиза нативных форм фермента, по сравнению с таковой у окуней из оз. Мотыкино. Не исключено, что в данном случае аутолиз инициирован воздействием ртути. Активация кальций-зависимого протеолиза в мышцах с более высоким уровнем ртути согласуется с данными (Gagne et al., 1990; Sakamoto et al., 1996) о дозо-зависимом повышении содержания ионизированного кальция в цитоплазме из внутриклеточных депо при воздействии препаратов ртути. Возможно, значение рН 4.5 является критической величиной, обуславливающей увеличение депонирования в органах рыб ртути.

Проблема закисления поверхностных вод актуальна также для малых озер Карелии. Даже при фоновом содержании компонентов ртути в среде, поступающих в водоемы при атмосферном переносе и с территорий водосборного бассейна, ее биогеохимический цикл в значительной степени преобразуется при воздействии сопутствующих факторов среды, главным образом, рН и содержания гуминовых веществ. Специфической особенностью поверхностных вод зоны тайги является повышенная заболоченность водосборной площади и, как следствие, высокое содержание гуминовых веществ и водородных ионов, обуславливающих кислую реакцию среды. Почти 70% озер таежной зоны имеют рН < 7.0. Внутренние водоемы Карелии, расположенные в зоне северной тайги, отличаются от более южных водных экосистем повышенной чувствительностью и низкой устойчивостью к антропогенному загрязнению (Заличева и др., 2002).

Сравнивали окуней, отловленных в водоемах Карелии: оз. Чучьярви, оз. Урос, оз. Вендорское Кондопожского р-на (бассейн р. Суна), оз. Вегарусьярви и оз. Вуонтеленьярви Суоярвского р-на (бассейн р. Шуя). Было проанализировано по 30 особей разных полов и возрастных групп из каждого водоема. Концентрацию соединений ртути в мышцах рыб определяли сотрудники ИБВВ РАН (Борок) с помощью метода атомной абсорбции (Назаренко и др., 1986). Исследуемые озера близки по ряду гидрохимических характеристик, но существенно различаются по степени закисленности и гумифицированности: оз. Чучьярви - рН 5.0, цветность 8 Hazen ([Hg] в мышцах окуней 0.10 мг/кг), оз. Урос - рН 5.9, 9 Hazen ([Hg] 0.12 мг/кг), оз. Вендорское - рН 7.0, 23 Hazen ([Hg] 0.15 мг/кг), оз. Вегарусьярви - рН 5.1, 105 Hazen ([Hg] 0.34 мг/кг), оз. Вуонтеленьярви - рН 4.6, 186 Hazen ([Hg] 0.53 мг/кг).

Сопоставляя данные о содержании ртути в органах окуня и гидрохимические параметры, выявляется четкая взаимосвязь концентрации ртути и цветности. Зависимость концентрации ртути и кислотности водоема нелинейна. Так, аккумуляция ртути заметно повышена у окуня из наиболее кислого озера (Вуонтеленьярви), а минимальна - у окуня из наиболее светловодного озера (Чучьярви).

Ведущий фактор в данном сочетании действий рН и цветности на биодоступность ртути для рыб выделить сложно, однако, реактивность некоторых биохимических показателей дает ключ к выявлению приоритетного фактора.

При визуальном наблюдении окуни из озера Вуонтеленъярви (наиболее закисленного и темноводного) отличаются от рыб из светловодных озер по окраске и состоянию внутренних органов, особенно печени, которая имеет более светлую окраску, включая цист, рыхлую структуру. Данные по возрастной характеристике рыб подтверждают вывод (Комов, 1999) о так называемой "тугорослой" форме окуня в связи с низкой скоростью линейного роста в кислых озерах по сравнению с обитающими в нейтральных. Следует также отметить, что при анализе отловленного материала из различных озер было обнаружено, что в оз. Вуонтеленъярви преобладают самки. В работе обсуждаются результаты, полученные для мышц и печени как главных мишеней для аккумуляции ртути в организме в связи с интенсивностью протекающих в них физиологических функций, обилием функциональных групп, обладающих сродством к ртути (мышцы) и ведущей роли в детоксикационных процессах (печень) посредством окислительных систем и низкомолекулярных серосодержащих белков.

Активность лизосомальной аспартильной (карбоксильной) протеиназы катепсина D, каталитическая способность которого напрямую не зависит от ковалентного связывания реакционных групп активного центра с ртутью, также различна у окуней из гидрохимически различающихся озер (рис. 8а,б). Реактивность катепсина D в этих условиях может быть связана с участием фермента в детоксикационных и иммунных процессах в лизосомах. Активация фермента положительно коррелирует с увеличением цветности озер, т.е. ведущим фактором в данном случае можно считать степень гумифицированности водоема.

Полученные результаты подтверждаются данными о повышенном содержании тиоловых групп (свободных и связанных с белками) в исследуемых тканях самцов и самок окуней из оз. Вуонтеленъярви (Nemova et al., 2003) Это свидетельствует в пользу того, что такие сопутствующие ртутному загрязнению факторы как закисление и гумифицированность среды имеют однонаправленное влияние на содержание белковых тиолов (компонентов низкомолекулярных белковых веществ, включая металлоионсинзы, и макромолекул, включая цистеиновые протеиназы) в мышцах и печени из стороны увеличения их концентрации.

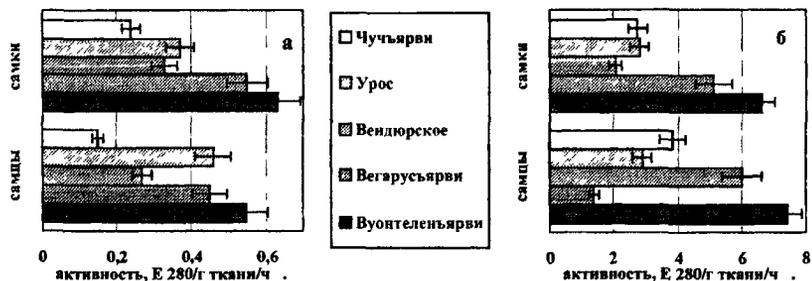


Рис. 8. Активность катепсина D (E₂₈₀/г ткани/ч) в мышцах (а) и печени (б) окуня *P. fluviatilis* из озер, различающихся кислотностью, гумифицированностью и аккумуляцией ртути в мышцах рыб

Активность цистеинзависимой протеиназы лизосом катепсина В снижается в исследованных тканях окуней из темноводных, "кислых" озер с повышенным накоплением ртути в мышцах рыб (рис. 9а,б).



Рис. 9. Активность катепсина В ($E_{525}/г$ ткани/30 мин) в мышцах (а) и печени (б) окуня *P. fluviatilis* из озер, различающихся кислотностью, гумифицированностью и содержанием ртути в мышцах рыб

Содержание белков в тканях рыб из наиболее закисленного и темноводного оз. Вуонтеленъярви в печени самок и самцов окуней было ниже в 1.7-2.4 раза, чем в соответствующих образцах из оз. Чучъярви. Содержание белка в мышцах в данных условиях не различается достоверно (исключение - окуни из оз. Урос), что, вероятно, обусловлено определенной стабильностью биомолекул, входящих в состав мышечной ткани.

В мышцах самок окуней активность кальпаинов (табл. 2) связана обратной зависимостью с величиной pH водоема: она минимальна у окуней из нейтрального оз. Вендюрское и максимальна у рыб из наиболее кислого оз. Вуонтеленъярви. Взаимосвязь исследуемого показателя с уровнем гумифицированности не прослеживается. Та же тенденция характерна и для жабр, при этом активность каталитически активной субъединицы кальпаина возрастает значительно. В гонадах самок достоверная активация наблюдается только у окуней из оз. Вуонтеленъярви, то есть ведущим фактором является кислотность среды. Однако роль гумифицированности становится очевидна при сравнении озер, близких по pH и достоверно различающихся по цветности - Чучъярви и Вегарусъярви - и выражается в подавлении как общей активности кальпаинов, так и снижении интенсивности автолиза нативных форм. Как следует из полученных в эксперименте данных, существенные отличия наблюдаются в активности кальпаина I: увеличение показателя напрямую зависит от снижения pH среды. Эта форма кальпаинов, судя по данным литературы, обнаруживает большую лабильность и в иных экологических и физиологических ситуациях (Kaivarainen et al, 1998; Bondareva et al., 2002). В данном случае мы наблюдали относительную стабильность активности кальпаина II. То, что ответная реакция протеолиза в цитозоле выражается в модуляции активности кальпаина I, косвенно указывает на развитие приспособительных реакций кальций-зависимого протеолиза в клетке. Наблюдаемые изменения активности кальций-активируемых протеиназ указывают на наличие половых различий в тканеспецифичности ответа на вышеуказанные факторы.

Таким образом, результаты исследования уровня активности протеолитических ферментов, содержания белка и тиоловых групп свидетельствуют о том, что в организме окуней, обитающих в озерах с более низким значением pH и сравнительно большим содержанием биодоступной ртути в мышцах рыб наблюдается снижение содержания белка, активация катепсина В и кальпаинов. Указанные показатели у окуней из нейтральных и низко-гумифицированных озер (Урос, Вендюрское) минимальны. Влияние степени гумификации, выявляемое при сравнении озер, близких по pH, но значительно различающихся по цветности (Чучъярви и Вуонтеленъярви), выражается в достоверных активации кальпаинов и катепсина

D, снижении активности катепсина В и концентрации белка. Активность аспартильной протеиназы катепсина D в большей степени коррелирует с уровнем гумификации. Эти результаты, а также визуальные наблюдения состояния внутренних органов окуней, отловленных из разных водоемов, свидетельствуют о неблагоприятном состоянии рыб из оз. Вуонтеленьярви и отрицательном влиянии на тиолы и цистеиновые (тиоловые) протеиназы, что обусловлено, скорее всего, воздействием ртути, усиливающимся, как известно, с закислением и органическим загрязнением водоема.

Таблица 2. Уровень Ca^{2+} -зависимой активности в тканях окуня *P. fluviatilis* из озер, различающихся кислотностью, гумифицированностью и аккумуляцией ртути в мышцах рыб

Ткань	пол	Удельная активность $\text{E}_{280}/\text{г}$ белка/час $\times 10^{-3}$ (M \pm m, n=8)			
		кальпаин I	кальпаин II	субъединица 80 кДа	суммарная
Оз. Чучъярви					
мышцы	♀	4 40 \pm 0 35	7 47 \pm 0 89	11 30 \pm 0 37	23 00 \pm 0 93
мышцы	♂	4 17 \pm 0 64	6 00 \pm 0 73	17 90 \pm 0 22	27 98 \pm 0 45
гонады	♀	1 30 \pm 0 16	1 13 \pm 0 11	0	2 26 \pm 0 31
жабры	♀	17 50 \pm 0 23	3 51 \pm 0 53	23 70 \pm 0 56	44 70 \pm 1 84
жабры	♂	17 00 \pm 1 04	2 00 \pm 0 24	13 00 \pm 0 45	32 00 \pm 1 78
Оз. Урос					
мышцы	♀	2 15 \pm 0 17	2 87 \pm 0 23	1 20 \pm 0 10	6 22 \pm 0 34
мышцы	♂	1 47 \pm 0 13	6 86 \pm 0 66	5 39 \pm 0 42	13 71 \pm 0 98
жабры	♀	6 78 \pm 0 57	4 24 \pm 0 51	14 69 \pm 1 02	25 71 \pm 1 15
жабры	♂	13 22 \pm 0 93	16 09 \pm 2 00	10 34 \pm 0 91	39 65 \pm 2 75
Оз. Вендюрское					
мышцы	♀	2.94 \pm 0 12	5 40 \pm 0 41	3 30 \pm 0 21	11 64 \pm 1 02
мышцы	♂	4.10 \pm 0 36	5 50 \pm 0 80	0 96 \pm 0 01	10 60 \pm 0 87
гонады	♀	2.30 \pm 0.28	0	0	2 30 \pm 0 04
гонады	♂	0	0	4 40 \pm 0.32	4 40 \pm 0 41
жабры	♀	5 20 \pm 0 64	30 00 \pm 1 58	0	35 20 \pm 1 45
Оз. Вегарусъярви					
мышцы	♀	0 54 \pm 0 04	1.62 \pm 0 13	3.23 \pm 0 27	5 39 \pm 0 41
мышцы	♂	2 25 \pm 1.45	3 60 \pm 0 31	0	5 85 \pm 0 40
гонады	♀	0 84 \pm 0 04	0 84 \pm 0 06	0	1 68 \pm 0 13
жабры	♀	0	2 26 \pm 0 19	3 69 \pm 0 32	5 95 \pm 0 40
Оз. Вуонтеленьярви					
мышцы	♀	5.10 \pm 0 61	15 87 \pm 0 11	12 70 \pm 1 48	33 70 \pm 2 75
мышцы	♂	18 40 \pm 0 18	8 00 \pm 0 93	9 78 \pm 0 23	36 20 \pm 1 05
гонады	♀	5 70 \pm 0 23	6 67 \pm 0 79	6 48 \pm 0 74	18 50 \pm 0 22
жабры	♀	19 40 \pm 0 49	16 13 \pm 0 45	63 40 \pm 2 28	98 90 \pm 5 86
жабры	♂	34 60 \pm 0 85	7 69 \pm 0 85	28 20 \pm 0 78	70 50 \pm 2 06

5.2. Влияние пищевой интоксикации соединениями ртути на протеолиз у карася *Carassius carassius* и окуня *Perca fluviatilis* L. в аквариальных условиях

Изучен дозо-зависимый эффект ртути на рыб в аквариальном эксперименте, поставленном сотрудниками ИБВВ РАН (Борок) под руководством д.б.н. В.Т. Комова. Для эксперимента рыба (окунь, карась) была отловлена в озере с нейтральным значением pH и акклимирована к лабораторным условиям в течение 20 дней (pH 8,0, T=14-15 °C). По истечении этого периода брали "исходную" точку. Далее опытные группы в течение 30 суток (окунь) или 75 суток (карась) кормили рыбным фаршем (объем корма - 4% от массы тела в сутки), содержащим ртутные компоненты в количествах 0.11 мг/кг ("контроль") и 0.48 мг/кг ("опыт").

Как показали данные, полученные в лаборатории экотоксикологии ИБВВ (группа В.Т. Комова) (табл. 3), уровень ртути, депонированной в органах рыб, четко коррелирует с количеством ртути в корме, что свидетельствует о биоаккумуляции токсиканта.

Таблица 3. Содержание ртути в мышцах рыб, подвергавшихся пищевой интоксикации соединениями ртути ($M \pm m$, $n=17$)

Вариант	Карась	Окунь
	<i>Carassius carassius</i>	<i>Perca fluviatilis</i>
"исходная" точка	0.24 ± 0.05	0.13 ± 0.05
контроль - 30 суток (в корме 0.11 мг/кг)	-	0.31 ± 0.02
опыт - 30 суток (в корме 0.48 мг/кг)	-	0.59 ± 0.05
контроль - 75 суток (в корме 0.11 мг/кг)	0.54 ± 0.03	-
опыт - 75 суток (в корме 0.48 мг/кг)	1.21 ± 0.04	-

На рисунке 10а приведены данные по изменению активности катепсина В в тканях рыб в аквариальном эксперименте. В печени карася наблюдается достоверная активация этой протеиназы в "контроле" по сравнению с "исходной" точкой, а в мышцах показатель стабилен. В мышцах окуней активность катепсина В возрастает в зависимости от дозы поступающей с пищей ртути.

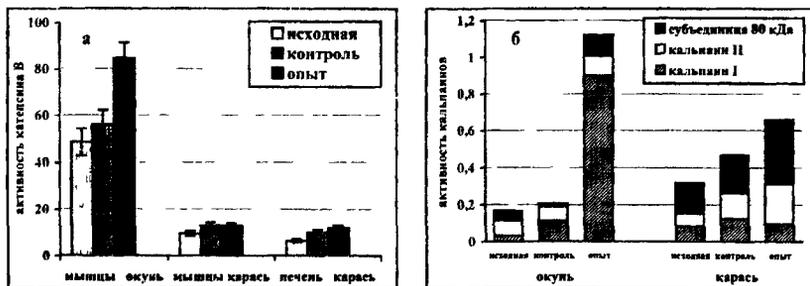


Рис. 10. Активность (а) катепсина В (E_{525} /г ткани/30 мин) в тканях и (б) кальпаинов (E_{280} /г ткани/ч) в мышцах окуня *P. fluviatilis* и карася *C. carassius* при пищевой интоксикации соединениями ртути

На рис 6б отражены значимые ($p \leq 0.05$) дозозависимые отличия активности кальпаина I у окуня из трех групп, отличия у карася недостоверны. Как уже отмечалось, этот показатель наиболее чувствителен к воздействию токсикантов. Характерно, что в данном случае наблюдается прирост активности кальпаина II у карася в ответ на высокое содержание ртути в корме. Кроме того, соединения ртути, по-видимому, инициируют

распад нативных форм кальпаинов, так как показан дозозависимый прирост субъединичной активности в мышцах карася. В целом, можно говорить об адаптивном характере изменений кальций-зависимого протеолиза при ведущей роли кальпаина I в так называемой "срочной" адаптации к изученному фактору.

Концентрация тканевых белков достоверно возрастает в органах карася из контрольной группы, т.е. при "слабом" воздействии, и близка к исходной в опытной группе. Это может отражать накопление белков с дефектной структурой, образовавшихся при непосредственном взаимодействии ртути и SH-групп белков, которые могут утилизироваться лизосомальной системой гидролаз. У окуня содержание белка достаточно стабильно.

Следует отметить, что в условиях данного эксперимента проявилась меньшая устойчивость карася к изучаемому фактору по сравнению с окунем; об этом свидетельствует и активация кальпаина II, характерная для развития патологических процессов в ткани (Johnson, 1990; Немова, 1996), и повышенный аутолиз основных форм кальпаина, а также отсутствие изменений со стороны лизосомального катепсина В, участвующего в процессах биотрансформации и экскреции ксенобиотиков из клеток, и увеличение белкового пула, вероятно, за счет дефектных макромолекул. Не исключено, что указанные негативные явления обусловлены помимо видовых особенностей и более длительным воздействием ртути на карася (75 сут), чем на окуня (30 сут).

С целью установления особенностей воздействия соединений ртути, обусловленных эволюционной спецификой теплокровных животных, был проведен модельный эксперимент по пищевой интоксикации крыс неорганическими солями ртути. Было показано, что острое воздействие ртути приводит к ингибированию цистеиновых протеиназ, а при длительном воздействии наблюдаются компенсаторные перестройки в белковом обмене. При этом хорошо растворимые соли оказывали более выраженное воздействие на ферменты в пнтозоле, а малорастворимые - в лизосомах. Пищевые энтеросорбенты незначительно компенсируют токсическое действие ртути. Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании в тканях рыб и крыс определенной специфики ответной реакции на уровне катаболизма внутриклеточных белков на ртутную интоксикацию, которая может быть связана с разной резистентностью к токсиканту и являться видоспецифической характеристикой.

Глава 6. Роль солености окружающей среды для водных организмов

Соленость - один из важнейших абиотических факторов среды. Способность гидробионтов существовать при значительных изменениях солености (эвригалинность) обусловлена различными приспособлениями, анализ которых позволяет разделить эвригалинные организмы на две основные группы. Одна из них - гомеосмотические животные (осморегуляторы), характеризующиеся наличием осмотической регуляции, основанной на работе механизмов активного транспорта ионов, прежде всего натрия и хлора, достаточно хорошо изучена на примере позвоночных животных, ракообразных и некоторых полихет (Гинесинский, 1963; Наточин, 1967, 1976; Проссер, 1977, и др.). Другая группа объединяет пойкилоосмотические организмы (осмоконформеры). Многие пойкилоосмотические организмы, не способные регулировать осмотическое давление жидкости внутренней среды, отличаются, тем не менее, значительной эвригалинностью. Морские моллюски, включая представителей семейства *Mytilidae*, относятся к типичным пойкилоосмотическим организмам, весьма эвригалинны и способны существовать в диапазоне солености от 4-5‰ до 75-80‰. Соленостные адаптации этих животных весьма разнообразны и гораздо хуже изучены, чем соответствующие приспособления гомеосмотических организмов. Ведущая роль в осмотической и объемной регуляции клеток моллюсков принадлежит неорганическим ионам (Наточин, Бергер, 1979), особенно натрию (Наточин и др., 1979). Помимо регуляции электролитного состава клеток, роль натрия важна в реализации клеткой генетической информации, регулировании биосинтетической "машины"

клетки в ходе ее ответа на внешние воздействия (Бергер, Харазова, 1971; Kroeger, 1967, 1977; Lezzi, 1970). При этом меняется скорость синтеза РНК и белка, преобразуется активность ряда ферментов, появляются новые изозимные фракции. Таким образом, адаптации к изменению солёности среды обеспечиваются деятельностью целого комплекса механизмов, среди которых важная роль принадлежит биохимическому метаболизму, лежащему в основе развития компенсаторных реакций клетки при адаптации к различным внешним воздействиям. Внутриклеточный протеолиз, как уже указывалось выше, является одним из необратимых регуляторных механизмов в клеточном метаболизме. Участие ферментов внутриклеточного протеолиза в развитии адаптивных реакций у водных организмов к изменению солёности до настоящего времени изучено достаточно фрагментарно. В связи с этим, мы изучили реакцию активности лизосомальных протеиназ и кальпаинов у мидий при изменении солёности среды обитания. Известно, что интенсивность обмена белков зависит от многих внутриклеточных факторов и, прежде всего, от ионных модуляторов (Харазова, 1974; Murauchi et al., 1981).

В качестве объектов исследования использовали мидий *Mytilus edulis*, собранных в августе 2002 года в литоральной и сублиторальной зонах Белого моря в районе биостанции ЗИН РАН "Картеши". Мидий распределяли по аквариумам с водой различной солёности: 5, 15, 25, 35 и 45‰ ($T=10^{\circ}\text{C}$). Контролем служили мидии, находящиеся в аквариуме при солёности 25‰, что соответствует солёности Белого моря. Пониженную солёность создавали добавлением пресной воды, повышенную - добавлением солей, идентичных по составу морской воде. Экспозиция опыта 12 суток.

Активность протеиназ лизосом - катепсинов В и D - изменялась в зависимости от солёности среды, в которой содержались мидии (рис. 11а,б). В интервале солёности, близком к контрольному (15‰ и 35‰), наблюдается частичное подавление активности катепсинов. Это может быть отражением общего снижения уровня белкового обмена при т.н. "умеренных" воздействиях факторов среды. При минимальной солёности (5‰) происходит значительная активация катепсинов В и D. Активация лизосомальных протеиназ, вероятно, является следствием стабилизации мембран лизосом, пропорциональной силе стресса (Mooge, 1985; Nicholson, 1999), что ускоряет гидролиз белков и обуславливает клеточную атрофию (Lowe, Clarke, 1989).

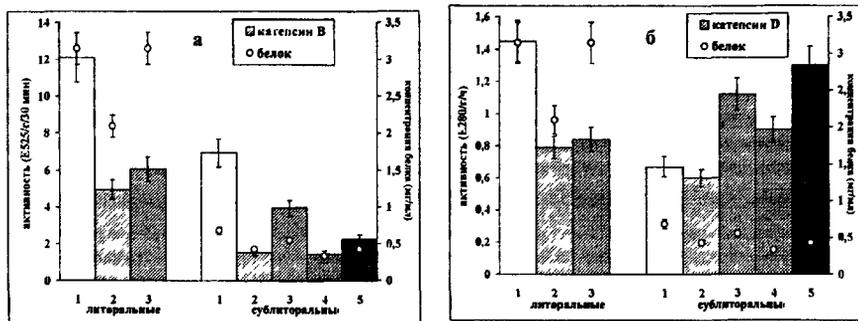


Рис. 11. Активность (а) катепсина В (E_{525} /г ткани/30 мин), (б) катепсина D (E_{280} /г ткани/ч) и содержание белков (мг/мл центрифугата) у мидий *Mytilus edulis* литоральной и сублиторальной зон Белого моря при акклимации к солёности: 1 - 5‰; 2 - 15‰; 3 - 25‰ (контроль), 4 - 35‰; 5 - 45‰

Фракции белкового элюата с M_r 110, 80 и 65 кДа, содержащие Ca^{2+} -зависимую протеолитическую активность у мидий после гель-хроматографического разделения на Sephacryl

S200, могут быть идентифицированы как гомологи кальпаина II (активируемого mM $[Ca^{2+}]_i$), кальпаина I (активируемого $\mu M [Ca^{2+}]_i$) и каталитически активной субединицы кальпаина высших животных. У мидий контрольной группы значения активности кальпаинов сопоставимы с таковыми у исследованных ранее морских и пресноводных рыб и млекопитающих (Toyohara et al., 1985; Melloni et al., 1992). Активация кальпаинов у мидий, выдержанных при повышенной солености, и подавление - при пониженной, отражают стрессовую реакцию клеточного метаболизма (рис. 12).

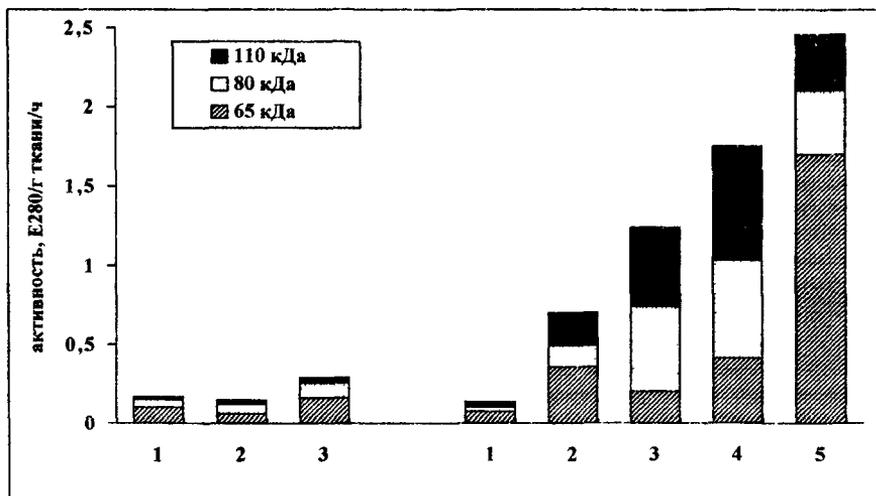


Рис. 12. Распределение общей Ca^{2+} -зависимой активности между молекулярными формами кальпаина (Mг 110, 80, 65 кДа) у мидий *M. edulis* литоральной и сублиторальной зон Белого моря при акклимации к солености: 1 - 5‰; 2 - 15‰; 3 - 25‰ (контроль); 4 - 35‰; 5 - 45‰

Реакция на уровне внутриклеточного протеолиза у мидий в эксперименте, по-видимому, имеет адаптивную направленность, поскольку не зафиксирована обычная для патологических перестроек гиперактивация кальпаина II (Johnson, 1990). Следует также учесть, что ионы Ca^{2+} и K^+ часто выступают в качестве аполярных антагонистов, и даже незначительное повышение внутриклеточного K^+ при повышении солености среды, может привести к тому, что K^+ начинает конкурировать с кальцием за участие в кальций-опосредованных процессах, в том числе выступая регулятором активности кальпаинов. В целом, относительная стабильность молекул ферментного белка, о чем свидетельствует незначительный прирост субъединичной активности кальпаинов, частично подтверждает тот известный факт, что у эвригалинных пойкилоосмотических беспозвоночных допустимые изменения концентрации солей, при которых обеспечивается сохранность нативной конформации различных макромолекул, гораздо шире, чем у стеногалинных беспозвоночных или позвоночных животных, поддерживающих постоянный электролитный состав клеток (Somero, Low, 1977). У мидий, выдержанных в средах, близких к типичной солености Белого моря, наблюдается незначительное уменьшение белкового пула в тканях (рис. 11а,б), что отражает некоторую супрессию белкового обмена в целом при так называемых "умеренных воздействиях". Подтверждением этому служат данные, полученные

методом автордиографии (по интенсивности включения ^{35}S -метионина и ^3H -глицина) для моллюсков *L. littorea*, обитающих в Белом море при солености 25-26‰: синтетическая деятельность клетки в условиях пониженной солености снижалась сразу после начала опыта и восстанавливалась при сохранении нагрузки через 28 часов (Харазова, Бергер, 1974).

Следует отметить, что у мидий, обитающих в литоральной зоне достоверные отклонения изучаемых параметров зафиксированы лишь при солености 5‰ (рис. 11а,б, 12). Преадаптированность этой группы мидий к обитанию в прибрежной зоне с неустойчивым температурным, соленостным и кислородным режимом выражается в повышенной устойчивости к гипоксии и факультативному анаэробизму, сопровождающих ответную реакцию на резкие колебания факторов среды. Параметры состояния системы протеолиза у мидий подтверждают данные о пределах диапазона толерантности вида по отношению к фактору солености. Значительное опреснение среды в большей степени угрожает стабильности обменных процессов на клеточном уровне, а, следовательно, и благополучию организма в целом, чем повышенная соленость. Несомненно, что дальнейшее детальное исследование приспособлений к изменению солености различных беспозвоночных, являющихся более примитивной, исходной формой адаптации, чрезвычайно важно не только для анализа эволюционных аспектов проблемы эвригалинности, но и в целом необходимо для создания общей теории адаптации (Уоддингтон, 1970).

Наряду с исследованиями внутриклеточного протеолиза у беспозвоночных при изменении солености среды обитания, были получены данные по влиянию солености среды на некоторые показатели белкового обмена у личинок атлантического лосося *Salmo salar* L. и наваги *Eleginus navaga* Pall., обитающей в открытом Белом море и в устье р.Кемь.

Лосось является представителем проходных (катадромных) рыб, в связи с чем является весьма эврибионтным видом, однако, не обладает способностью к осморегуляции на ранних стадиях жизненного цикла (Idler et al., 1959). При аквариальной акклимации смолтов к полосоленой воде общий уровень кальций-зависимой активности снижается в решающей мере за счет подавления активности субъединицы 80 кДа. Однако наблюдается достоверная активация кальпаина I, что объясняется прежде всего повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - основного эффектора активности кальпаинов - на данной стадии развития (Party, 1961). Кроме того, высокий уровень натрия в организме, обусловленный его концентрацией в морской воде (Kroeger, 1967, 1977; Lezzi, 1970), может приводить как к снижению синтеза фермента *de novo*, так и к сокращению белковых субстратов протеиназ. Еще одним вероятным механизмом регуляции активности кальпаинов может быть значительное уменьшение содержания ненасыщенных высокореактивных липидов (Lovett, 1950). Кроме того, осморегуляторные процессы требуют дополнительных энергетических затрат, что в целом может привести к некоторой супрессии прочих путей метаболизма.

Сравнение показателей в тканях наваги из различных биотопов показало, что наблюдаемые изменения уровня активности протеиназ в большей степени обусловлены вариацией солености и минерализации среды, чем ухудшением экологического состояния в дельте р.Кемь по сравнению с открытым морем. Так, известно, что изменение солености в эстуарии влияет на концентрацию кальция в клетках водных организмов (Scheuhammer et al., 1997), являющегося основным эффектором кальпаинов. При этом следует отметить тканеспецифичность ответа протеолитической системы на состояние среды. Изменение среды обитания наваги в устье р.Кемь отражается на биохимическом статусе рыб, и в первую очередь адаптивные изменения происходят в жабрах - органе, ответственном за процессы осморегуляции и непосредственно соприкасающемся с содержащимися в воде химическими соединениями.

ВЫВОДЫ

1. Основные внутриклеточные протеолитические ферменты у исследуемых рыб и водных беспозвоночных, представленные лизосомальными катепинами В и D и кальций-активируемыми протеиназами пшитозоля, участвуют в регуляции их функционального состояния. При этом показано их синергическое действие в различных эколого-физиологических ситуациях.

2. Протеиназы исследуемых ракообразных, моллюсков, костистых рыб по физико-химическим свойствам обнаруживают сходство между собой и различаются только уровнем активности и лабильностью в ряде экологических ситуаций. Это указывает на их определенную эволюционную консервативность.

3. Реактивность протеолитических ферментов у водных организмов в ответ на изменение солености среды зависит от степени сформированности осморегуляторного аппарата и физиологической толерантности вида к фактору солености.

4. Активность и свойства изученных протеиназ отражают степень загрязнения водоемов поллютантами различной природы - компонентами промышленных и бытовых сточных вод, при этом хищные виды рыб и самцы обнаруживают меньшую резистентность.

5. Активность и свойства внутриклеточных протеиназ отражают биохимический статус гидробионтов в условиях загрязнения водоемов ртутью, при этом значителен вклад сопутствующих факторов среды (ацидности и гумификации) в биодоступность соединений ртути. Внутриклеточные протеиназы принимают участие в процессах поддержания клеточного гомеостаза при кратком (в эксперименте) и хроническом воздействии ртути.

6. Изменение активности внутриклеточных протеиназ у исследуемых водных организмов в условиях изменяющихся факторов среды свидетельствует об участии этих ферментов в развитии компенсаторного или патологического процесса. Динамика активности и свойства протеиназ в различных эколого-физиологических ситуациях позволяет оценить пределы резистентности и толерантности внутриклеточного протеолиза у изученных видов и служит дополнительным биохимическим критерием при оценке влияния на гидробионтов изменяющихся естественных и антропогенных факторов среды.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Nemova, N., Kaivarainen, E., Krupnova, M., Bondareva, L. The effect of toxic factors on intracellular proteinase activity in freshwater fish. Proceedings of 5th conf. "Ichthyohaematology", Protivin, Czech Republic. 1998. P. 72.
2. Kaivarainen, E., Nemova, N., Krupnova, M., Bondareva, L. The effect of toxic factors on intracellular proteinase activity in freshwater fish. Acta vet. Brno 67. 1998. P. 306-316.
3. Nemova, N., Bolotnikov I., Bondareva L., Ostashkova V., Volokhova N. The effect of inorganic mercury salts on cysteinic proteinase activity in rats: comparative characterization. In: V intern. conf. on mercury as a global pollutant, Rio de Janeiro, Brazil. 1999. P. 152.
4. Nemova, N., Kaivarainen, E., Krupnova, M., Bondareva, L. Intracellular proteinases of freshwater fish as indicators of ecological load. In: III intern. symp. on monitoring and sustainable management of Lake Ladoga and other large lakes, Petrozavodsk. 1999. P.71.
5. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А. Комплексный подход к тестированию природных сред. Тез. докл. междунаrod. конф. "Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова Восточной Фенноскандии", Петрозаводск. 1999. С. 17.
6. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Бондарева Л.А. Роль внутриклеточных протеолитических ферментов в созревании и раннем развитии лосося *Salmo salar* L. Тез. докл. междунаrod. конф. "Атлантический лосось *Salmo salar*: биология, запасы, воспроизводство", Петрозаводск. 2000. С. 70-71.
7. Nemova, N., Kaivarainen, E., Bondareva, L. Detection and properties of calpain in some fish erythrocytes. In: Sixth European symposium on calcium binding proteins in normal and transformed cells, Paris, France. 2000. P. 37-38.

8. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Бондарева Л.А. Обнаружение и свойства кальпаина в эритроцитах некоторых рыб. *Материалы междунаро. конф. "Биокатализ 2000"*. М.: Изд-во МГУ, 2000. С. 134-135.
9. Nemova N., Kaivarainen E., Krupnova M., Bondareva L., Toivonen L., Komov V. The effect of mercury and acidity on biochemical indices of freshwater fish. In: *The intern. conf. "The biological essentiality of macro and trace elements"*, Jena, Germany..2000. P. 814-818.
10. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Бондарева Л.А., Крупнова М.Ю. Влияние соединений ртути на кальцийактивируемые протеиназы пресноводных рыб. *Матер. междунаро. конф. "Экологическая физиология и биохимия рыб"*, Ярославль, 2000. С. 74-75.
11. Немова Н. Богдан В., Кяйвяряйнен Е., Крупнова М., Смирнов Л., Тойвонен Л., Гурьянова С., Бондарева Л., Суховская И. Влияние соединений ртути и закисления водоемов на биохимический статус рыб. *Тез. докл. междунаро. конф. "Поморье в Баренц Регионе: Экономика, экология, культура"*, Архангельск, Институт экологических проблем Севера УрО РАН. 2000. С. 166.
12. N.N. Nemova, E.I. Kaivarainen and L.A. Bondareva: Ca^{2+} -activated neutral proteinase in some fish erythrocytes. *Vestnik moskovskogo Universiteta. Khimia*. 2000. Vol.41, № 6. Suppl. P. 106-108.
13. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А. Роль внутриклеточных протеиназ в эколого-биохимических адаптациях у пресноводных рыб. *Материалы конф. "Экологические проблемы онтогенеза рыб (физиолого-биохимические аспекты)"*. М.: Издательство МГУ, 2001. С.171-177.
14. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен 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. *Вопросы ихтиологии*. 2001. Т.41, №5, с. 704-707.
15. Немова Н., Кяйвяряйнен Е., Крупнова М., Богдан В., Смирнов Л., Тойвонен Л., Гурьянова С., Бондарева Л., Комов В. Биохимическая индикация влияния ртути на рыб. *Тез. докл. конф. "Современные проблемы биондикации и биомониторинга"*, Сыктывкар. 2001. 137-138 с.
16. Bondareva L.A., Nemova N.N., Kaivarainen E.I., Krupnova M.Yu. Effects of dietary intoxication by mercury salts on cysteine proteinase activity in rat tissues. In: *3rd Intern. Symposium "Trace Elements in Human: New Perspectives"*. Greece, Athens. 2001. P.11.
17. L.A. Bondareva, N.N. Nemova, E.I. Kaivarainen, M.Yu. Krupnova, V.V. Ostashkova. Effects of the dietary intoxication by mercury salts on cysteine proteinase activity in rat tissues and detoxic role of absorbents. *Proceedings of 3rd Intern. Symposium "Trace Elements in Human: New Perspectives"* Greece, Athens. 2001. 98-105 pp.
18. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А., Богдан В.В., Мухин В.А. Механизмы протеолитической регуляции в развитии гидробионтов. *Вопросы рыболовства*. 2001. С. 189-192.
19. Бондарева Л.А. Ca^{2+} -активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных. *СПб.: Вестник молодых ученых №4, 2002 (Серия: Науки о жизни №1, 2002)*. С. 52-57.
20. Бондарева Л.А., Кяйвяряйнен Е.И., Немова Н.Н., Шкляревич Г.А. Кальцийактивируемые протеолитические ферменты (кальпаины) у амфипод. *Тез. докл. V симп. "Химия протеолитических ферментов"*, Москва, 2002. С. 53.
21. Luidmila A. Bondareva, Nina N. Nemova, Elena I. Kaivarainen, Marina Yu. Krupnova. The effect of mercury compounds on intracellular proteolysis in freshwater fish. In: *11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA 11)*, Berkeley, California USA. 2002, p. 136-137.
22. Бондарева Л.А., Кяйвяряйнен Е.И., Немова Н.Н. Кальпаины эритроцитов форели *Salmo trutta* L. *Тез. науч. докл. III съезда биохим. общества, СПб., 2002*. С. 569.
23. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Бондарева Л.А. Ca^{2+} -активируемые протеиназы у рыб и водных беспозвоночных. *Тез. науч. докл. III съезда биохим. общества, СПб., 2002*. С. 554.
24. Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А. Механизмы внутриклеточного протеолиза в биохимических адаптациях у гидробионтов. *Тез. докл. междунар. семинара "Современные проблемы физиологии и экологии морских животных (рыбы, птицы, млекопитающие)"*, Ростов-на-Дону, 2002. С. 124-126.
25. Nina N. Nemova, Elena I. Kaivarainen, Marina Ju. Krupnova, Lyudmila A. Bondareva. Intracellular proteinases in fish as indicators of environmental load. *Extended abstracts in: "The 2nd AMAP Intern. Symp. on Environmental Pollution of the Arctic"*, Rovaniemi, Finland, 2002.

26. Bondareva, L., Kaivarainen, E., Krupnova, M., Nemo cell proteolytic enzyme system in some fish. In: "Macro and 711-716.

27. Л.А. Бондарева, Е.И. Кяйвяряйнен, М.Ю. Крупно ние загрязнения прибрежной акватории Белого моря на (Gammaridae). Тез. докл. конф. "Современные проблем 135-136.

28. Н.Н. Немова, Е.И. Кяйвяряйнен, М.Ю. Крупнова, нова, Л.В. Тойвонен, Л.А. Бондарева, И.В. Суховская, 1 озер на биохимический статус органов у рыб, отлича Тез. докл. конф. "Современные проблемы водной токсик 29.

29. L. Bondareva, E. Kaivarainen, M. Krupnova, N. Nem. some fish under the effect of ore-dressing sewage. In: "XXI century: ecological science in Armenia", Yerevan, 2002. P. 136.

30. Бондарева Л., Немова Н., Кяйвяряйнен Е., Крупнова М., Остапкова В. Влияние пищевой нитоксикации солями ртути на активность цистеиновых протеиназ в тканях крыс. Известия АН Серия биол., № 1, 2003. С. 47-50.

31. Lyudmila A. Bondareva, Elena I. Kaivarainen, Marina Yu. Krupnova, Nina N. Nemova. The methylation process in limnic sediments affects mercury bioavailability. In: "2nd Intern. Conf on Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, Applications", Czech Republic, Prague, 2003, p. 48.

32. Nemova N.N., Bogdan V.V., Gurjanova S.D., Krupnova M.Yu., Kaivarainen E.I., Smirnov L.P., Toivonen L.V., Bondareva L.A., Sukhovskaya I.V., Komov V.T. Effects of mercury and water acidification on fish biochemical status. In: the XI Intern. Symp. on Bioindicators "Modern Problems of Bioindication and Biomonitoring", Russia, Syktyvkar, 2001. Ed. Syktyvkar, 2003. P. 308-318.

33. Л.А. Бондарева, Н.Н. Немова, Е.И. Кяйвяряйнен, М.Ю. Крупнова. Влияние стоков горно-обогатительного комбината на систему внутриклеточного протеолиза у рыб. Тез. докл. междуна род. конф. "Экологические проблемы бассейнов крупных рек - 3", Тольятти, 2003. С. 39.

34. Bondareva L., Kaivarainen H., Nemova N. Evolution of molecular forms and biological role of calcium-dependent proteolytic enzyme. In: "9th Meeting of PhD Students in Evolutionary Biology", Switzerland, Fiesch, 2003. P. 19-20.

35. N. Nemova, E. Kaivarainen, L. Bondareva, S. Guryanova, M. Krupnova, L. Toivonen, V. Komov. The effect of modeling dietary uptake of mercury compounds on intracellular proteolysis in muscle of freshwater fish. In: the 4th Intern. Symp. "Trace Elements in Human: New Perspectives", Part I. Athens, Greece, 2003. 836-844 pp.

36. Н.Н. Немова, М.Ю. Крупнова, Е.И. Кяйвяряйнен, Л.А. Бондарева, И.Н. Бахмет. Влияние различных концентраций солености на протеолитическую систему мидий *Mytilus edulis* Белого моря. Тез. междуна род. науч. конф. "Инновации в науке и образовании - 2003". Калининград, 2003. С. 36.

37. Lyudmila A. Bondareva, Helena I. Kaivarainen, Nina N. Nemova. Evolution of the adaptive response reactions of sulfur-containing bioligands on mercury contamination in various animals. In: "10th Meeting of PhD Students in Evolutionary Biology", Shrewsbury, Great Britain, 2004. P. 11.

РНБ Русский фонд

2005-4

12550

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 25.08.04. Формат 60×84^{1/16}.

Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.

Уч.-изд. л. 1,5. Усл. печ. л. 1,6. Тираж 100 экз. Изд. № 50. Заказ № 433.

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел