

УДК: 577 152.34

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАДМИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ  
ПРОТЕИНАЗ В МЫШЦАХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *ONCORHYNCHUS MYKISS* (0+)

М. Ю. Крупнова, И. В. Суховская, Е. В. Борвинская, Н. Н. Немова

EFFECT OF CADMIUM IONS ON THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEASES  
IN MUSCLES OF RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* (0+)

M. Yu. Krupnova, I. A. Sukhovskaya, E. V. Borvinskaya, N. N. Nemova

Изучено влияние хлорида кадмия (5 мкг/л (ПДК) и 25 мкг/л (5 ПДК) при разных сроках экспозиции на активность протеолитических ферментов лизосом (катепсины D и B) в мышцах сеголетков радужной форели, содержащихся в аквариальных условиях. Показано, что на начальном этапе интоксикации (экспозиция 3 сут, ПДК) ионы кадмия не оказывают заметного влияния на действие катепсина D, а при увеличении концентрации соли кадмия в пять раз (3 сут) отмечено повышение его активности по сравнению с таковой в контрольной группе. Экспозиция соли кадмия в течение 10 сут в концентрации, соответствующей 5 ПДК, привела к снижению активности катепсина D в мышцах исследуемых рыб по сравнению с контрольными образцами. Рост активности катепсина D на третьи сутки эксперимента (5 ПДК), возможно, связан с лабильзацией лизосомальных мембран под действием хлорида кадмия (закисление среды), а отмеченное в дальнейшем понижение активности данного фермента (10 сут, ПДК) отражает включение механизмов защиты мембран. Несколько иные зависимости обнаружены в изменении активности катепсина B (цистеинзависимая протеиназа лизосом) в мышцах форели в тех же экспериментальных условиях. Так, на третьи сутки экспозиции при концентрации хлорида кадмия, соответствующей ПДК (5 мкг/л), отмечена максимальная активность данного фермента. С увеличением концентрации токсиканта (25 мкг/3 сут) и времени экспозиции (ПДК, 10 сут) уровень активности фермента в мышцах рыб снижался по сравнению с контролем.

Полученные данные показывают, что при поступлении в организм в повышенных дозах соли кадмия могут выступать ингибиторами некоторых лизосомальных протеиназ, что в конечном счете приводит к изменению соотношения синтеза и деградации белков в организме. Проведенные исследования свидетельствуют об участии лизосомальных протеиназ в реализации защитной функции лизосом.

*лизосомы, катепсин D, катепсин B, кадмий, форель*

The effect of 5 µg/L cadmium chloride (maximum allowable concentration (1MAC) according to the Russian state standard for water quality) and 25 µg/L (5MAC) on the activity of lysosomal proteases (cathepsin D and cathepsin B) was studied in the muscles of the yearlings rainbow trout for different exposure time. At the first 3 days of

exposure at 1MAC, cadmium ions did not have a noticeable effect on the activity of cathepsin D, in turn the 5MAC of cadmium caused increase of its activity relative to the control group. After 10 days of exposure at 5MAC, activity of cathepsin D decreased in the fish muscles compared to the control group. The increase in cathepsin D activity at 5MAC at the 3<sup>rd</sup> day is possibly related with the increase of the lysosomal membranes labialisation under the cadmium chloride exposure (acidification of the medium), whereas further decrease of the activity on the 10<sup>th</sup> day indicates activation of the lysosomal membrane protection mechanisms. Cysteine-dependent lysosomal protease cathepsin B in trout muscles was shown to have another response to cadmium under the same experimental conditions. The maximum activity of this enzyme was on the 3<sup>rd</sup> day of exposure at the concentration of cadmium chloride corresponding to 1MAC (5 µg/l). Then, the activity of the enzyme decreased with an increase of toxicant concentration (25 µg/L, 3 days) and exposure time (1MAC, 10 days) in comparison to the control.

The obtained data confirm that elevated doses of cadmium can inhibit some lysosomal proteases, which, eventually, can disturb a balance between protein synthesis and degradation in the organism. The research contributes to the understanding of the role of lysosomal proteases in the realization of the protective function of lysosomes.

*lysosomes, cathepsin D, cathepsin B, cadmium, trout*

## ВВЕДЕНИЕ

Тяжелые металлы занимают особое место в ряду токсических факторов, воздействующих на живые организмы. Им свойственна высокая биологическая активность, они легко переносятся в организме. Загрязненность водоемов тяжелыми металлами – один из самых распространенных видов антропогенного воздействия. Особое место в ряду тяжелых металлов занимают так называемые неэссенциальные – кадмий, свинец и ртуть, которые обладают сравнительно высокой токсичностью, легко поглощаются рыбами, адсорбируясь через жабры и желудочно-кишечный тракт, и накапливаются в тканях внутренних органов. Так, кадмий обладает канцерогенным, гонадотропным, эмбриотропным, мутагенным и нефротоксическим действием. В клетке он инактивирует металлоферменты, участвующие во многих метаболических процессах, нарушает проницаемость мембран, ингибирует окислительное фосфорилирование, синтез белков и нуклеиновых кислот [1 – 3]. В процессе эволюции сформировались различные защитные механизмы, снижающие токсическое действие поллютантов, к ним, в частности, относится и реализация защитной функции лизосом, которая осуществляется при участии лизосомальных гидролаз, включающих, наряду с другими гидролазами, комплекс протеолитических ферментов, активных в кислой области рН (катепсинов) [4]. Лизосомальные протеиназы являются биохимическими индикаторами изменения протеолитической функции лизосом при формировании биохимических адаптаций у водных организмов на всех стадиях развития. Основная функция этих гидролаз заключается в их участии в белковой деградации и регуляторных реакциях ограниченного протеолиза [5]. Катепсин D относится к группе аспартильных протеиназ, так как в активном центре группы кислых протеиназ, аналогичных по своему действию пепсину, принимают участие карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты. Этот фермент гидролизует только белковые субстраты и поэтому определяется,

главным образом, по изменению продуктов деградации белков [6]. Катепсин В является представителем цистеинзависимых протеиназ, функционирующих в слабокислой и нейтральной среде (рН 5-7) и имеющих в активном центре тиоловые группы в цистеиновых остатках. Данному ферменту отводится приоритетное участие в регуляторных процессинговых реакциях, а не в белковой деградации [5]. В настоящей работе изучали изменение активности основных лизосомальных протеиназ животных тканей – катепсинов В (тиолзависимой протеиназы) и D (аспартильной протеиназы) в мышцах форели при воздействии солей кадмия в эксперименте *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В эксперименте использовали сеголетков радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (0+). Моделирование хронического загрязнения водной среды тяжелыми металлами производилось в аквариальных условиях. Перед началом эксперимента в аквариальном комплексе были установлены и стабилизированы гидрохимический и температурный режимы (12 - 14°C). Токсикологическому исследованию во всех случаях предшествовал этап предадаптации в течение 14 сут. Опытных животных разделили на три группы по семь особей в каждой. Первая группа форели служила контролем и находилась в аквариуме с водопроводной водой, вторая – была помещена в аквариум с добавлением растворимой соли кадмия ( $\text{CdCl}_2$ ) в концентрациях 5 мкг/л (ПДК для рыбохозяйственных целей), третья группа – 25 мкг/мл (концентрация, в пять раз превышающая ПДК). Все гидробионты содержались при одинаковых условиях освещения, температуры и аэрации, без кормления. Биохимические анализы проводили на третьи и десятые сутки экспозиции рыб в токсической среде параллельно с контрольной их группой. Необходимо отметить, что в аквариуме с концентрацией кадмия, превышающей ПДК в пять раз, к концу третьих суток погибло 50 % рыбы. При высокой концентрации загрязняющих веществ наблюдается гибель организма, так как чрезмерные концентрации тех или иных веществ блокируют действие регуляторных систем или непосредственно воздействуют на какой-либо орган, вызывая его гибель, а затем гибель организма в целом [7]. Несмотря на то, что в большей степени подвержены влиянию действия тяжелых металлов печень и почки, в работе были изучены мышцы, которые составляют основу массы тела рыб.

Активность основных протеиназ лизосом - катепсинов В и D определяли в осветленных гомогенатах мышечной ткани рыб, которые готовили на 0,25М растворе сахарозы (1:10) с добавлением 0,01%-ного раствора тритона X-100 (1200 об/мин x 60 с). Центрифугирование гомогенатов для получения фракции, обогащенной лизосомами, проводили на центрифуге К-24 (Германия) [8].

Активность катепсинов В и D определяли спектрофотометрически: катепсина В – по гидролизу 0,065М раствора этилового эфира бензоиларгинамида в 0,1М ацетатном буфере рН 5,0 [1], катепсина D – бычьего гемоглобина при рН 3,6 [9] соответственно. Активность ферментов выражали в условных единицах: катепсина D – 280, катепсина В – 525 нм на мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Брэдфорд [10].

Экспериментальные работы выполнены с использованием оборудования ЦКП НО Института биологии КарНЦ РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты изучения активности катепсинов в мышечной ткани форели свидетельствуют о том, что на начальном этапе интоксикации (экспозиция 3 сут, ПДК) ионы кадмия не оказывают заметного влияния на действие катепсина D, а при увеличении концентрации соли кадмия в пять раз (3 сут) отмечено повышение его активности (примерно на 30%) по сравнению с таковой в контрольной группе, что, возможно, связано с усилением протеолиза дефектных (поврежденных) белковых структур, возникающих в результате воздействия токсикантов [11].

Экспозиция соли кадмия в течение 10 сут в концентрации, соответствующей 5 ПДК, привела к снижению активности катепсина D в мышцах исследуемых рыб по сравнению с контрольными образцами (рисунок).

Рост активности катепсина D на третьи сутки эксперимента (5 ПДК), возможно, связан с лабильзацией лизосомальных мембран под действием хлорида кадмия (закисление среды), а отмеченное в дальнейшем понижение активности данного фермента (10 сут, ПДК) отражает включение механизмов защиты лизосомальных мембран.

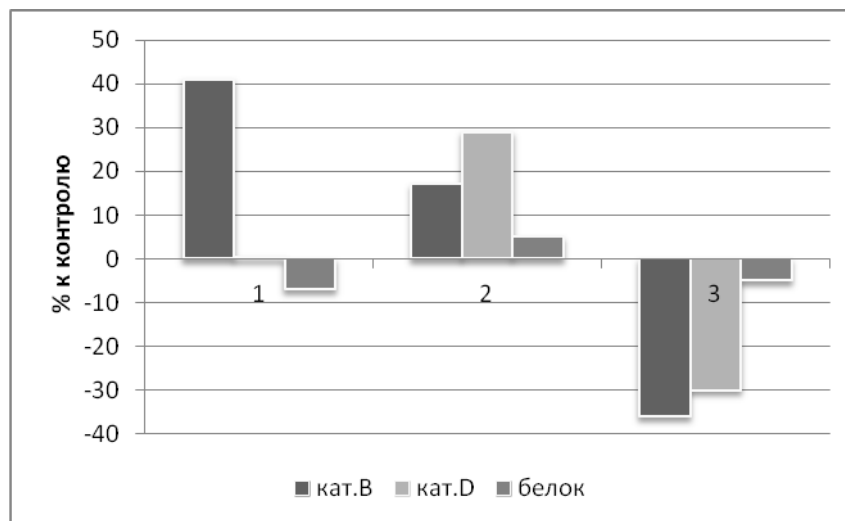


Рис. Влияние хлорида кадмия на активность лизосомальных протеиназ и содержание белка в мышцах форели (% к контролю). 1 – ПДК (3 сут); 2 – 5 ПДК (3 сут); 3 – ПДК (10 сут)

Fig. Effect of cadmium chloride on the activity of lysosomal proteases and the content of protein in the trout muscles (% to the control). 1 - MAC (3 days); 2 – 5MAC (3 days); 3 - MAC (10 days)

Несколько иные зависимости обнаружены в изменении активности катепсина В (цистеинзависимая протеиназа лизосом) в мышцах форели в тех же экспериментальных условиях. Так, на третьи сутки экспозиции при концентрации хлорида кадмия, соответствующей ПДК (5 мкг/л), отмечена максимальная активность данного фермента. С увеличением концентрации токсиканта (25 мкг/3 сут) и времени экспозиции (ПДК, 10 сут) уровень активности катепсина В в мышцах рыб снижался по сравнению с контролем более чем на

40%. Аналогичные изменения были отмечены ранее в работах, посвященных изучению активности цистеинзависимой протеиназы лизосом в тканях окуней из загрязненных, закисленных озер с повышенным накоплением ртути в мышцах этого вида рыб [12].

### ВЫВОДЫ

Полученные данные подтверждают, что при поступлении в организм в повышенных дозах соли кадмия могут выступать ингибиторами реакций лизосомального протеолиза, что в конечном счете отразится на соотношении процессов синтеза и деградации белков в организме [13, 14]. Увеличение концентрации солей кадмия (5 ПДК, 10 сут) привело к гибели форели, связанной с длительным токсическим воздействием тяжелых металлов.

При этом содержание белка в мышцах форели в присутствии хлорида кадмия на протяжении всего периода наблюдений практически не изменялось.

Результаты проведенных исследований по определению активности лизосомальных протеиназ в мышцах радужной форели при интоксикации хлоридом кадмия показали различную степень и направленность изменений в зависимости от времени экспозиции и концентрации токсиканта. Более продолжительное воздействие солей кадмия (10 сут) повлекло резкое снижение активности протеолитических ферментов (30-40%), подтверждая, вероятно, неспособность ферментной системы адаптироваться к данному токсиканту.

Таким образом, результаты изучения влияния соли кадмия на активность катепсинов В и D в мышцах сеголетков форели, содержащихся в аквариальных условиях, свидетельствуют об участии этих катепсинов в реализации защитной функции лизосом, что было установлено нами ранее при изучении влияния на лизосомальный протеолиз рыб токсических факторов различного происхождения [15 – 18].

*Работа выполнялась в рамках государственного задания (тема № 0221-2014-0033).*

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Протеолитическая активность тканей карпа и воблы под влиянием хлорида кадмия / С. И. Курбанова [и др.] // Экология животных Юга России: экология, развитие. – 2013. – № 1. – С. 62 – 66.
2. Алиновская, Ю. Б. Восстановление некоторых физиологических показателей карпа после отравления ионами кадмия / Ю. Б. Алиновская // Рыбохозяйственная наука на пути в XXI век: всерос. конф. молодых ученых (21-23 мая): материалы. – Владивосток: Изд-во ТИНРО, 2001. – С.4 – 6.
3. Руднева, И. И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов / И. И. Руднева // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123. – № 4. – С. 391 – 400.
4. Дин, Р. Процессы распада в клетке / Р. Дин. – Москва: Мир, 1980. –120 с.

5. Лысенко, Л. А. Протеолитическая регуляция биологических процессов: моногр. / Л. А. Лысенко, Н. Н. Немова, Н. П. Канцерова. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. – 482 с.
6. Barrett, A. J. Lysosomalenzymes / A. J. Barrett, M. Heath // In: Dingle J. T. (ed.). Lysosomes. A laboratory handbook, Amsterdam. – 1977. – P. 19 – 27.
7. Лукин, А. А. Приспособительные реакции и патогенез рыб Европейского Севера России при антропогенном воздействии: автореф. дис. .... докт. биол. наук: 03.00.16 / Лукин Анатолий Александрович; Петрозаводск, 2001. – 46 с.
8. Покровский, А. А. Изменение ферментов лизосом при белковой недостаточности // А. А. Покровский, В. А. Тутельян // Биохимия. 1968. – Т. 33. – № 4. – С. 809 – 816.
9. Алексеенко, Л. П. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов / Л. П. Алексеенко // Современные методы в биохимии: в 2 т. – Москва: Медицина, 1968. – Т. 2. – С.112.
10. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M.Bradford // Analit. Biochem. – 1976. – V.72. – P. 248 – 254.
11. Волошина Г. Э. Экологическая оценка состояния поверхностных вод реки Понуры / Г. Э. Волошина // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2006. – Т. 2. – № 1. – С. 118 – 122.
12. Мур, Дж. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния / Дж. Мур, С. Рамамурти. – Москва: Мир, 1987. – 288 с.
13. Мартин, Р. Бионеорганическая химия токсичных ионов металлов / Р. Мартин // Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – Москва: Мир, 1993. – С. 25 – 61.
14. Sorensen, E. M. Metal poisoning in fish. U.S.A. / E. M. Sorensen // Texas: CRC Press. – 1992. – 362 P.
15. Немова, Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб / Н. Н. Немова. – Москва: Наука, 2005. – 163 с.
16. Влияние токсических факторов на протеолитическую активность в икре и ранних личинках рыб / Н. Н. Немова [и др.] // Известия РАН. Сер. Биология. – 1994. – № 4. – С. 605 – 610.
17. Немова, Н. Н. Эколого-биохимическое тестирование водоемов по состоянию рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров // Научные аспекты экологических проблем России. – Москва: Наука. – 2002. – Т. 1. – С. 215 – 220.
18. Немова, Н. Н. Лизосомальные протеолитические ферменты – один из критериев оценки физиолого-биохимического состояния рыб / Н. Н. Немова, М. Ю. Крупнова // Инновации в науке, образовании и бизнесе – 2005: IV Междунар. науч. конф. (18-20 окт.): труды. – Калининград, 2005. – С. 116 – 117.

## REFERENCES

1. Kurbanova S. I., Rabazanov N. I., Nurmagomedova P. M., Magomedova Z. M., Magomedova M. M. Proteoliticheskaja aktivnost' tkanej karpa i vobly pod vlijaniem hlorida kadmija [Proteolytic activity of carp and vobla tissues under the influence of cadmium chloride]. *Jekologija zhivotnyh Juga Rossii: jekologija, razvitie*, 2013, no. 1, pp. 62-66.

2. Alinovskaja Ju. B. Vosstanovlenie nekotoryh fiziologicheskikh pokazatelej karpa posle otravlenija ionami kadmija [Restoration of some physiological indicators of carp after poisoning with cadmium ions]. *Trudy Vseros. konf. Molodyh uchenyh «Rybohozjajstvennaja nauka na puti v XXI vek»* [Proc. of All-Russian Conf. Young scientists "Fishery science on the way to the XIII century"]. Vladivostok, 2001, pp. 4-6.
3. Rudneva I. I. Jekologo-fiziologicheskie osobennosti antioksidantnoj sistemy ryb i processov perekisnogo okislenija lipidov [Ecological and physiological features of the antioxidant system of fish and processes of lipid peroxidation]. *Uspehi sovremennoj biologii*, 2003, vol. 123, no. 4, pp. 391-400.
4. Din R. *Processy raspada v kletke* [Decay processes in a cell]. Moscow, Mir, 1980, 120 p.
5. Lysenko L. A., Nemova N. N., Kancerova N. P. *Proteoliticheskaja reguljacija biologicheskikh processov* [Proteolytic regulation of biological processes]. Petrozavodsk, Karel'skij nauchnyj centr RAN, 2011, 482 p.
6. Barrett A. J., Heath M., Lysosomal enzymes in: Dingle J. T. (ed.). *Lysosomes. A laboratory handbook*, Amsterdam, 1977, pp. 19-27.
7. Lukin A. A. *Prisposobitel'nye reakcii i patogenez ryb Evropejskogo Severa Rossii pri antropogennom vozdejstvii. Avtoref. diss. dokt. biol. nauk* [Adaptive reactions and pathogenesis of fish of the European North of Russia under anthropogenic influence. Abstract of dis. dr. sci.]. Petrozavodsk, 2001, 46 p.
8. Pokrovskij A. A., Tutel'jan V. A. Izmenenie fermentov lizosom pri belkovoj nedostatochnosti [Change in enzymes of lysosomes with protein deficiency]. *Biohimija*, 1968, vol. 33, no. 4, pp. 809-816.
9. Alekseenko L. P. *Opredelenie aktivnosti proteinaz po rasshhepleniju belkovyh substratov* [Determination of the activity of proteinases on the cleavage of protein substrates]. *Sovremennye metody v biohimii*. Moscow, Medicina. 1968, vol. 2, pp. 112.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analit. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.
11. Voloshina G. Je. Jekologicheskaja ocenka sostojanija poverhnostnyh vod reki Ponura [Ecological assessment of the surface water of the Ponura River]. *Jekolog. vest. Sever. Kavkaza*, 2006, vol. 2, no. 1, pp. 118-122.
12. Mur Dzh, Ramamurti S. *Tjzhelye metally v prirodnyh vodah: Kontrol' i ocenka vlijanija* [Heavy metals in natural waters: Control and assessment of influence]. Moscow, Mir, 1987, 288 p.
13. Martin R. *Bioneorganicheskaja himija toksichnyh ionov metallov* [Bio-organic chemistry of toxic metal ions]. *Nekotorye voprosy toksichnosti ionov metallov*. Moscow, Mir, 1993, pp. 25-61.
14. Sorensen E. M. *Metal poisoning in fish*. U.S.A. Texas: CRC Press., 1992, 362 p.
15. Nemova N. N. *Biohimicheskie efekty nakoplenija rtuti u ryb* [Biochemical effects of mercury accumulation in fish]. Moscow, Nauka, 2005, 163 p.
16. Nemova N. N., Krupnova M. Ju., Kjavjarajnen E. I., Volkov I. V. Vlijanie toksicheskikh faktorov na proteoliticheskiju aktivnost' v ikre i rannih lichinkah ryb [The influence of toxic factors on proteolytic activity in eggs and early fish larvae]. *Izvestija RAN. Ser. biol.*, 1994, no. 4, pp. 605-610.

17. Nemova N. N., Vysockaja R. U., Sidorov V. S. *Nauchnye aspekty jekologicheskikh problem Rossii* [Scientific aspects of environmental problems in Russia]. Moscow, Nauka, 2002, vol. 1, pp. 215-220.

18. Nemova N. N., Krupnova M. Ju. Lizosomal'nye proteoliticheskie fermenty – odin iz kriteriev ocenki fiziologo-biohimicheskogo sostojanija ryb [Lysosomal proteolytic enzymes – one of the criteria for assessing physiological and biochemical status of fish]. *Trudy Mezhdunarodnoi konferencii «Innovacii v nauke, obrazovanii i biznese-2005»* [Processes of International Conference «Innovations in Science, Education and Business-2005»]. Kaliningrad, 2005, pp. 116-117.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

*Крупнова Марина Юрьевна* – Институт биологии Карельского научного центра РАН (Петрозаводск); кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической биохимии; E-mail: mukrupnova@rambler.ru

*Krupnova Marina Yurievna* – Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Petrozavodsk); Candidate of Biological Sciences; Senior Researcher of the Laboratory of Environmental Biochemistry; E-mail: mukrupnova@rambler.ru

*Суховская Ирина Викторовна* – Институт биологии Карельского научного центра РАН (Петрозаводск); кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экологической биохимии; E-mail: sukhovskaya@inbox.ru

*Sukhovskaya Irina Viktorovna* – Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Petrozavodsk); Candidate of Biological Sciences; Researcher of the Laboratory of Environmental Biochemistry; E-mail: sukhovskaya@inbox.ru

*Борвинская Екатерина Витальевна* – Институт биологии Карельского научного центра РАН (Петрозаводск); кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экологической биохимии; E-mail: katsu@inbox.ru

*Borvinskaya Ekaterina Vitalievna* – Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Petrozavodsk); Candidate of Biological Sciences; Researcher of the Laboratory of Environmental Biochemistry; E-mail: katsu@inbox.ru

*Немова Нина Николаевна* – Институт биологии Карельского научного центра РАН (Петрозаводск); доктор биологических наук; чл.-корр. РАН; главный научный сотрудник; E-mail: nemova@krc.karelia.ru

*Nemova Nina Nikolaevna* – Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (Petrozavodsk); Doctor of Biological Sciences; Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; Chief Researcher of the Laboratory of Environmental Biochemistry; E mail:nemova@krc.karelia.ru