

УДК 577.3:574.152.632

## **АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ОРГАНАХ ЩУК (*ESOX LUCIUS* L.), ОТЛОВЛЕННЫХ ИЗ ОЗЕР С РАЗЛИЧНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ**

**М. Ю. Крупнова, Н. В. Ильмаст, Н. Н. Немова**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

Исследована активность основных лизосомальных протеиназ (катепсинов D и B) в органах щук (*Esox lucius* L.) из озер с различной антропогенной нагрузкой. Результаты свидетельствуют об участии катепсинов в реализации защитной функции лизосом у исследованных рыб в ответ на повышенное содержание лития, калия, сопутствующих анионов, сдвиг pH и взмученность в хранилище отходов горнообогатительного комбината.

Ключевые слова: протеиназы, лизосомы, рыбы, экология.

### **M. Yu. Krupnova, N. V. Ilmast, N. N. Nemova. ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES IN ORGANS OF PIKE (*ESOX LUCIUS* L.) FROM LAKES WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC PRESSURE**

We investigated the activity of basic lysosomal proteinases (cathepsins D & B) in organs of pike (*Esox lucius* L.) from lakes exposed to different degrees of human pressure. The results evidence that cathepsins play a part in enacting the lysosomes' protective function in the fish in response to elevated concentrations of lithium, potassium, accompanying anions, shift in pH, and sediment detachment in the tailings dump of the mining and ore concentration mill.

Key words: proteinases, lysosomes, fish, ecology.

#### **Введение**

Действие на организм различных факторов внешней среды, в том числе экологических, сопровождается вовлечением клеточных и молекулярных механизмов регуляции гомеостаза. Среди множества таких механизмов важное место занимает протеолиз, являющийся (в силу своей необратимости) прерогативой выживания организмов [Баррет, Хит, 1980]. Ферментативные превращения и экскреция чужеродных соединений осуществляются с участием протеолитической системы лизосом, включающей более 20 ферментов, из которых почти

90 % связано с активностью катепсинов B и D [Дин, 1981]. Лизосомальные протеиназы (катепсины D и B) являются биохимическими индикаторами изменения протеолитической функции лизосом в развитии биохимических адаптаций у водных организмов в ответ на воздействие неблагоприятных факторов различной природы [Немова, Высоцкая 2004; Высоцкая, Немова, 2008].

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 аспарагино-

вой кислоты. Этот фермент гидролизует только белковые субстраты и поэтому определяется главным образом по измерению продуктов деградации белков [Barrett, 1998]. В лизосомном протеолизе катепсин D преимущественно действует синергически с цистеиновыми протеиназами, которые, вероятно, имеют еще большее значение в деградации многих белков и с другими эндопептидазами.

В статье приведены результаты исследования активности лизосомальных протеиназ в органах щук из двух водоемов Республики Карелия – озер Каменное и Костомукшское.

## Материал и методы

Озеро Каменное практически не затронуто хозяйственной деятельностью, промысел рыбы в нем отсутствует, о чем свидетельствует большое число старших возрастных групп рыб в ихтиоценозе. Данные исследований состояния ихтиофауны водоема свидетельствуют о крайне незначительном антропогенном воздействии. С рыбохозяйственной точки зрения озеро относится к высшей категории водных объектов, так как в нем обитают такие ценные виды, как лосось, сиг, ряпушка. В целом экосистема оз. Каменное, и в частности ихтиофауна, сохраняет естественное состояние и близка к «ненарушенным природным экосистемам». Озеро Костомукшское – верхний водоем системы р. Кенти (частный водосбор р. Кеми). В результате строительства дамбы озеро преобразовано в технологический водоем Костомукшского горнообогатительного комбината (хвостохранилище). Водоем служит для захоронения отходов производства (хвостов обогащения, которые в виде пульпы поступают в водоем) и оборотного водоснабжения. Общая минерализация воды в период исследования колебалась от 625 (дно 12 м) до 645 мг/л (поверхность), концентрация ионов калия составила 156 мг/л, натрия – 18, кальция – 38, магния – 18, хлоридов – 7, гидрокарбонатных ионов – 122; величина общего азота – 15 мг/л, общего фосфора – 0,0070–0,12 мг/л; pH – 7,4–7,5 [Lehto et al., 2010]. Таким образом, по сравнению с показателями, полученными в более ранних (2000 г.) исследованиях, наблюдается значительное увеличение общей минерализации воды и уменьшение водородного показателя. Сдвиг pH воды от щелочной в кислую область может разрушить так называемый геохимический барьер, что приведет к увеличению в воде концентраций тяжелых металлов и нежелательному их накоплению в биоте хвостохранилища и расположенных ниже водоемах. Обедненность видового состава ихтиофауны и ее низкие количественные показатели свидетельствуют об угнетенном состоянии планктонной фауны хвостохранилища. В уловах

2009 г. были отмечены только четыре вида (плотва, щука, сиг, уклейка) рыб. Обращает на себя внимание отсутствие в озере окуневых (окунь, ерш) видов – типичных представителей северных водоемов. Большие концентрации щелочных и щелочно-земельных металлов, а также гидрокарбонатов в воде определили сдвиг pH в щелочную область. Подобные условия представляют собой геохимический барьер для миграции большинства тяжелых металлов. Несмотря на то что хвостохранилище является технологическим водоемом горнообогатительного комбината, куда поступают производственные воды, видимых патологических изменений наружных покровов и внутренних органов у рыб не отмечено, внутреннее состояние органов у щук из исследованных водоемов идентично. При анализе размерно-весовых параметров у щуки из разных водоемов достоверных изменений веса не обнаружено.

Материалом для исследований служили печень, почки, жабры, гонады и мышцы щуки из этих водоемов. Активность основных протеиназ лизосом – катепсинов В и D – определяли в осветленных гомогенатах тканей рыб, которые готовили на 0,25М растворе сахарозы (1:10) с добавлением 0,01% раствора тритона X-100 (1200 об/мин x 60 с). Дифференциальное центрифугирование гомогенатов для получения субклеточных фракций проводили на центрифуге K-24 (Германия) [Покровский, Тутельян, 1976]. Активность катепсинов В и D определяли спектрофотометрически. Активность катепсина В оценивали по гидролизу 0,065М раствора этилового эфира бензоиларгинамида в 0,1М ацетатном буфере pH 5,0 [Алексеевко, 1968], катепсина D – бычьего гемоглобина при pH 3,6 [Алексеевко, 1968] соответственно. Активность ферментов выражали в условных единицах: катепсина D – при 280нм на мг белка, катепсина В – при 525нм на мг белка. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Брэдфорд [Braedford, 1976].

## Результаты и обсуждение

Результаты изучения активности протеолитических ферментов и содержания белка в органах щук из разных водоемов представлены на рис. 1–3.

Наиболее высокие значения активности катепсина D у щук как из оз. Каменное, так и из оз. Костомукшское отмечены в почках, печени, несколько в меньшей степени – в гонадах самцов и самок, в жабрах и наименьшие – в мышцах (см. рис. 1). Не обнаружено существенных различий в уровне активности протеиназ в зависимости от пола исследуемого объекта. В печени, жабрах и гонадах самок активность данного фермента несколько ниже у щук из оз. Костомукшское по сравнению с данными показателя

ми у щук из оз.Каменное. Аналогичная тенденция, за исключением активности катепсина D в печени, отмечена и для самцов, где данный показатель в почках, мышцах, жабрах и гонадах снижается приблизительно в 2–3 раза. Снижение уровня активности катепсина D в жабрах (более чем в 2 раза), которые являются основным «фильтром» и в первую очередь подвергаются влиянию какого-либо соединения, подтверждает участие этого фермента в детоксикационных процессах, происходящих в лизосомах [Высоцкая, Немова, 2008; Крупнова и др., 2010].

Активность катепсина B сравнительно низкая в органах щук из обоих водоемов (см. рис. 2). При этом отмечено некоторое повышение активности в печени самок и самцов и жабрах самцов щук, выловленных в оз. Костомукшское. Существенная (более чем в 60 раз) активация данного фермента наблюдается в почках самцов из хвостохранилища. Известно, что в условиях хронической интоксикации активно функционируют органы, осуществляющие процессы захвата, обезвреживания токсикантов и

экскреции [Покровский, Тутельян, 1976]. Возможно, в связи с изменениями химического состава минералов хвостов, а именно повышенного содержания солей лития и калия, ведущих к выщелачиванию различных компонентов, а вследствие этого и к изменению гидрохимических показателей воды хвостохранилища, наблюдается столь значительное повышение активности цистеинзависимой протеиназы в почках. Некоторые различия в изменении активности катепсинов B и D связаны, вероятно, с тем, что катепсин B относится к ферментам, в состав активного центра которых входит высокореактивная тиоловая группа цистеина, вступающая в химические взаимодействия с тяжелыми металлами и другими химическими группировками поллютантов. Защелачивание водоема хвостохранилища в результате воздействия отходов ГОКа может оказывать ингибирующее влияние на активность катепсина D, для проявления которой необходимы кислотные группировки аспарагиновой кислоты, входящей в состав активного центра фермента.



Рис. 1. Активность катепсина D (E<sub>280</sub> мг белка/14ч) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

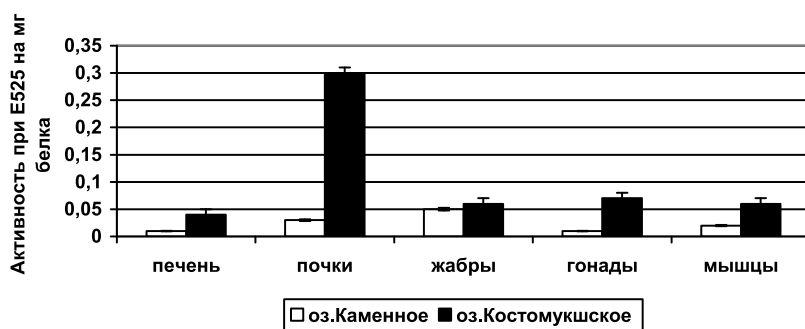


Рис. 2. Активность катепсина B (E<sub>525</sub> мг белка/30 мин) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

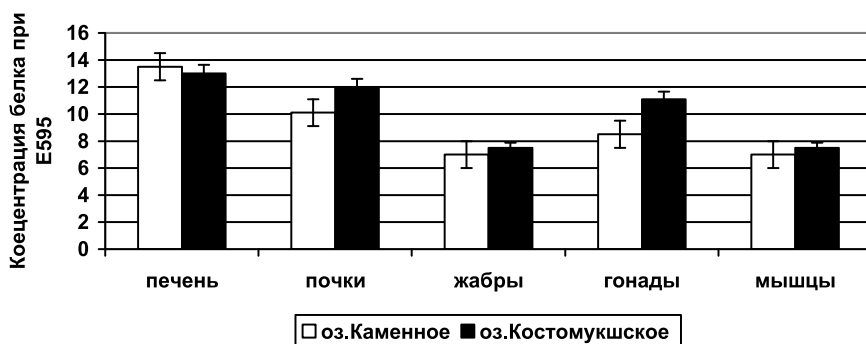


Рис.3. Содержание белка (мг/мл) в органах самцов и самок щук из озер Каменное и Костомукшское (хвостохранилище отходов)

Показатели содержания белка (см. рис. 3) в тканях самцов и самок щук рыб из «контрольного» и «опытного» озер близки или чуть выше в органах рыб из оз. Костомукшское, исключением является уровень белка в гонадах самок из хвостохранилища, что связано, по-видимому, со стадией зрелости.

Следует отметить и тот факт, что, по данным ихтиологических исследований, в опытном водохранилище количество самцов ниже, чем самок, это связывают с их меньшей устойчивостью к неблагоприятным факторам среды.

Полученные результаты свидетельствуют об участии катепсинов в реализации защитной функции лизосом у исследованных рыб в ответ на воздействие антропогенной нагрузки, связанной с деятельностью горнообогатительного комбината (повышенное содержание лития и калия, сопутствующих анионов, сдвиг pH и взмученность). Данные показатели (активность цистеинзависимых и аспартильных протеиназ) могут быть использованы в качестве дополнительных биохимических тестов на загрязнение водоемов вышеназванными факторами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4, РФФИ № 08-04-01140-а, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы».*

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### **Крупнова Марина Юрьевна**

старший научный сотрудник, к.б.н.  
ИБ КарНЦ РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: mukrupnova@rambler.ru  
тел. (8142) 571879

### **Ильмаст Николай Васильевич**

ведущий научный сотрудник, к.б.н.  
ИБ КарНЦ РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: ilmast@krc.karelia.ru  
тел. (8142) 571879

### **Немова Нина Николаевна**

директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической физиологии растений, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН  
ИБ КарНЦ РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910  
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru  
тел. (8142) 783615

## Литература

- Алексеев Л. П.* Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1968. Т. 2. С. 112.
- Баррет А. Дж., Хит М. Ф.* Лизосомальные ферменты // Лизосомы. Методы исследования. М.: Мир, 1980. С. 25–156.
- Высоцкая Р. У., Немова Н. Н.* Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб // М.: Наука, 2008. 284 с.
- Дин Р.* Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.
- Крупнова М. Ю., Немова Н. Н., Скидченко В. С.* Влияние солей меди и кадмия на активность лизосомальных протеиназ мидий *Mytilus edulis* L. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Сб. науч. ст. Петрозаводск, 2010. Т. 1. С. 84–88.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. У.* Биохимическая индикация состояния рыб // М.: Наука, 2004. 214 с.
- Покровский А. А., Тутельян В. А.* Лизосомы // М.: Наука, 1976. 351 с.
- Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F.* Handbook of proteolytic enzymes. L.: Academic Press., 1998. 1666 p.
- Braedford 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. P. 248–254.
- Lehto J., Lusa M., Virkanen J. et al.* Metal distribution in lakes surrounding the Kostomuksha iron mine and ore dressing mill in Northwestern Russia // Air, Soil and Water Research. 2010. Vol. 3. P. 67–77.

### **Krupnova, Marina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: mukrupnova@rambler.ru  
tel. (8142) 571879

### **Ismast, Nikolai**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: ilmast@krc.karelia.ru  
tel. (8142) 571879

### **Nemova, Nina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: nemova@krc.karelia.ru  
tel. (8142) 783615