



15. Pavlinov I.J., Kruskop S.V., the Warsawskiy A.V. Animals of land of Russia. The Dictionary-determinant. M., 2002. 298 p.
16. Tembotov A.K. Geography of mammals of Caucasus. Nalchik: Elbrus, 1972. 245 p.
17. Tembotov A.K. Resource of live fauna. P. 2. Vertebrate animals of a land. Rostov on-Don: Publishing house of the Rostov university, 1982. 320 p.
18. Tembotov A.K., Shhashamishev H.H. Fauna of Kabardino-Balkariya. Nalchik: Elbrus, 1984. 190 p.
19. Teplov V.P. Woolf in the Caucasian reserve // The Caucasian state reserve. 1. Pp. 366-443.
20. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes // Stain Technol., 1956. Vol. 31. Pp. 247-251.
21. Matthey R. Chromosomes des Vertebres Lausanne: F. Riuge, 1949. 35 p.
22. Wenhui Nie, Jinhuan Wang et al. The genome phylogeny of domestic cat, red panda and five mustelid species revealed by comparative chromosome painting and G-banding // Kluwer Academic publishers. Printed of the Netherlands. Chromosome Research, 2002. 10. Pp. 209-222.
23. Wurster D.H. Cytogenetic and Philogenetic studies in Carnivora // Comparative mammalian cytogenetics / ed. K. Benirschke: Heidelberg N.Y.: Springer – Verl., 1969. Pp.310-329.

УДК 597.5

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕЙ КАРПА И ВОБЛЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХЛОРИДА КАДМИЯ

© 2013 Курбанова С.И., Рабазанов Н.И., Нурмагомедова П.М.,
Магомедова З.М., Магомедова М.М.
Дагестанский государственный университет
Дагестанская государственная медицинская академия

Изучено влияние $CdCl_2$ (0,25 мг/л) на активность протеолитических ферментов в тканях карповых рыб. Полученные результаты подтверждают участие катепсина D и нейтральных протеаз в развитии ответной реакции организма на действие ионов кадмия.

The effect of $CdCl_2$ (0.25 mg / l) on the proteolytic enzyme activities of the carp tissue are studied. The results confirm the involvement of cathepsin D and neutral protease in the development of the organism's response to the action of cadmium ions

Ключевые слова: катепсин D, протеазы, кадмий, карп

Keywords: cathepsin D, proteases, cadmium, carp

Введение. Состояние водных экосистем отражает общее состояние биосферы, антропогенное воздействие на которую постоянно растет. К настоящему времени в результате многопланового влияния человека трансформированы практически все крупные водные объекты. Среди живых организмов, обитающих в водоемах, рыбы в силу биологических особенностей являются идеальным объектом, позволяющим оценить степень этих трансформаций. По состоянию популяций и организмов рыб можно составить представление о состоянии их обитания, о качестве воды, определить степень нагрузки на экосистему.

Среди загрязнителей водных экосистем на первое место выходят тяжелые металлы [8]. Они обладают высоким индексом биоаккумуляции и даже в следовых концентрациях оказывают влияние на метаболизм гидробионтов, что негативно сказывается на рыбных ресурсах. К одним из наиболее токсичных для рыб тяжелых металлов относят кадмий [4].

Кадмий по своей токсичности близок к ртути и мышьяку. Основная часть кадмия (90-98%) поступающего в водные экосистемы имеет антропогенное происхождение. Попадая в водоемы, ионы кадмия не подвергаются деструкции и не выводятся естественным путем из водной среды. Они легко поглощаются рыбами, и аккумулируются в тканях внутренних органов рыб: в печени, жабрах, почках, желудочно-кишечном тракте, мышцах. В клетке кадмий, инактивирует металлоферменты, участвующие во многих метаболических процессах, нарушает проницаемость мембран, ингибирует окислительное фосфорилирование, синтез белков и нуклеиновых кислот [4, 2,14,15].

В этой связи для раскрытия механизмов, наблюдаемых деградационных изменений в организмах и популяциях рыб, возникает необходимость в изучении действия загрязняющих веществ на защитные системы организма, выполняющие барьерную функцию на клеточном уровне [10,16,12].

Одним из основных инструментов в механизмах клеточной защиты при влиянии токсических факторов среды является система протеолитических ферментов [11,6].



Целью настоящей работы явилось исследование активности ферментов белкового обмена при длительном (хроническом) загрязнении среды ионами кадмия и определение возможности их использования в качестве чувствительных дополнительных индикаторов для мониторинга состояния природных вод.

Материал и методы исследования. В качестве объекта исследования использованы сеголетки карпа (*Cyprinus carpio* L.) и двухлетки воблы (*Rutilus rutilus*). Моделирование хронического загрязнения водной среды тяжелыми металлами производилось в аквариальных условиях. В аквариумах создавались условия постоянного температурного (19-22°C) и газового режима.

В хроническом лабораторном опыте был испытан хлорид кадмия с содержанием в водной среде 0,25 мг/л (ПДК – 0,005 мг/дм³) [5].

Биохимические анализы проводили на 5, 15, 30 и 40 сутки экспозиции рыб в токсической среде параллельно с контрольной группой. В опыт брали ткани из следующих органов: печень, кишечник, белая и красная мышца.

Активность катепсина Д определяли методом Ансона с некоторыми модификациями [13]. Суммарную активность нейтральных протеаз определяли модифицированным методом Лоури по гидролизу казеина [1].

Статистическую обработку результатов проводили методом малой выборки по t- критерию Стьюдента [7]. Построение диаграмм осуществлено при помощи пакета Excel 7.0.

Результаты и их обсуждение. На рисунках 1, 2 и 3, 4 приведены данные по влиянию хлорида кадмия на активность катепсина Д и суммарную активность нейтральных протеаз в тканях карпа и воблы.

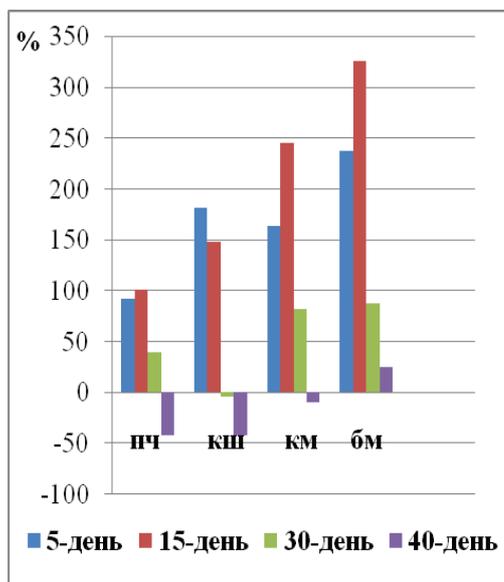


Рис.1 Изменение активности катепсина Д в тканях сеголеток карпа при хроническом воздействии хлорида кадмия (в % к контролю)

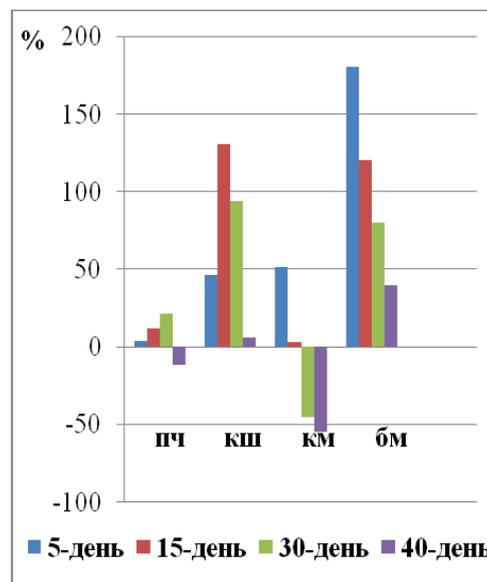


Рис.2 Изменение активности катепсина Д в тканях двухлеток воблы при хроническом воздействии хлорида кадмия (в % к контролю)

Как показывают наши результаты динамика активности катепсина Д в тканях исследованных рыб подвержена значительным отклонениям от нормы. Содержание карпов в водной среде с хлоридом кадмия в течение 5 суток приводит к повышению активности катепсина Д в печени по сравнению с контролем почти вдвое, в кишечнике 2,9 раза, в красных мышцах в 2,6 раза, и в белых - в 3,4 раза. В эти же сроки интоксикации активность катепсина Д в печени воблы не отличается от контроля, а в кишечнике, красных и белых мышцах выше контроля на 46,2 %, 51,5 % и 3,2 раза соответственно.

По нашим данным на 15 день интоксикации рыб в токсической среде с кадмием в печеночной ткани карпа активность катепсина Д повышается в 2 раза, в кишечнике в 2,5 раза, в красных и белых мышцах в 3,4 и 4,2 раза соответственно. У воблы тоже наблюдается повышение активности катепсина Д по сравнению с контролем в печени на 11,8 %, кишечнике в 2,3 раза. В красных мышцах воблы активность катепсина Д в эти же сроки интоксикации находится на уровне контроля, тогда как в белых мышцах она выше контроля в 2,2 раза.

Продление сроков пребывания сеголеток карпа в среде с ионами кадмия до 30 дней приводит к снижению активности катепсина Д в печени на 39,5% по отношению к контролю, а у воблы активность фермента продолжает повышаться (21,7 %). К 40 дню интоксикации наблюдается тенденция к снижению.

В кишечнике карпа к 30 дню интоксикации ионами кадмия активность катепсина Д не отличается от нормы, а у воблы все еще выше контроля в 1,9 раза (P<0,001). К 40 дню эксперимента активность фермента в кишечнике карпа ниже контроля на 41,9%, а у воблы не отличается от контроля.

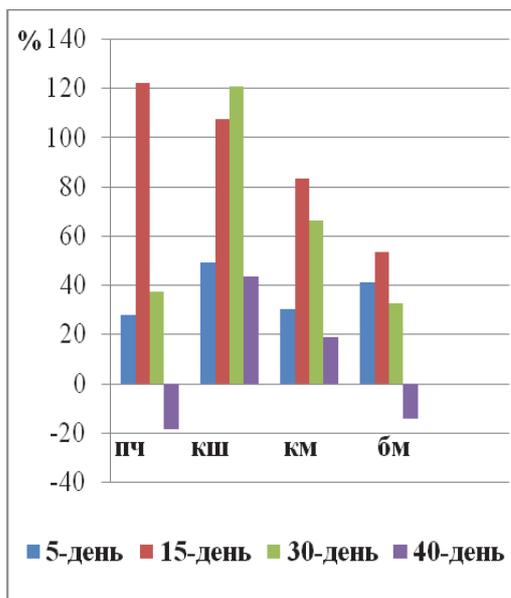


Рис.3 Изменение активности нейтральных протеаз в тканях сеголеток карпа при хроническом воздействии хлорида кадмия (в % к контролю)

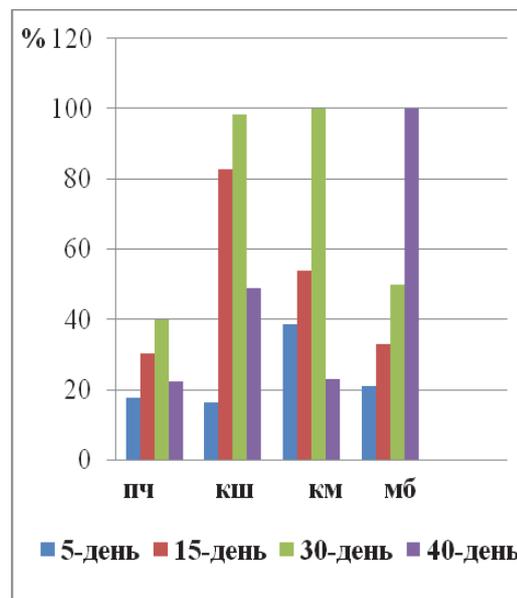


Рис.4 Изменение активности нейтральных протеаз в тканях двухлеток воблы при хроническом воздействии хлорида кадмия (в % к контролю)

Активность катепсина Д карпа к 30 дню интоксикации по сравнению с контролем выше в красных мышцах на 45,4%, в белых мышцах в 1,8 раза. К концу эксперимента (40 сутки) активность данного фермента в этих тканях возвращается к норме.

У воблы наоборот, активность фермента в красных мышцах при 30 дневной интоксикации ионами кадмия ниже контроля на 45,4%. Это снижение в красных мышцах продолжается и к 40 дню (на 54,2%). В белых мышцах воблы активность катепсина Д на 30 сутки выше контроля в 1,8 раза. На 40 день наблюдается снижение по отношению к 30 дню, но сравнительно с контролем выше на 40%.

Нейтральные протеазы представлены ферментами, локализованными в цитозоле, и активно участвуют не только в распаде белков, но и в процессах активации различных ферментов из их предшественников. Они выполняют в разных тканях животных общие регуляторную и сигнальную функции, и поэтому неконтролируемое повышение активности этих ферментов может иметь фатальные последствия для организма [18].

На начальном этапе интоксикации (5 сутки) ионы кадмия не влияют на суммарную активность нейтральных протеаз (САНП) в печени сеголеток карпа, а в печени воблы повышается по сравнению с контролем на 17,5% ($P < 0,02$).

В кишечнике карпа и воблы САНП повышается на 49,0% и 16,4%, по сравнению с контролем соответственно. Ионы кадмия также повышают САНП в красных мышцах карпа и воблы на 28,3 % и 38,5% соответственно. В белых мышцах карпа активность фермента выше контроля на 40,8 % , и у воблы наблюдается лишь тенденция к повышению.

Пребывание сеголеток карпа до 15 дней в токсической среде с ионами кадмия приводит к повышению САНП по сравнению с контрольными значениями в печени и в кишечнике в 2 раза. Повышение САНП наблюдается также в красных и белых мышцах в 1,8 и 1,5 раза.

Суммарная активность нейтральных протеаз воблы на данном этапе интоксикации ионами кадмия в печени повышается на 30,2%, в кишечнике в 1,6 раза, в красных мышцах 1,5 раза, а в белых мышцах – на 26%.

При продлении сроков пребывания карпа и воблы до 30 дней в среде с ионами кадмия САНП в печени все еще выше контроля на 37,4 % и 39,7%, а в кишечнике – в 2,2 и 1,8 раза соответственно.

Пролонгирование интоксикации до 30 суток приводит к снижению САНП в красных и белых мышцах карпа на 66,0 и 28,6% по отношению к контролю, а у воблы САНП выше в 2 и 1,5 раза соответственно.

К 40 дню САНП в печени карпа под воздействием ионов кадмия ниже контроля на 18,7%. В кишечнике САНП под влиянием токсиканта снижается по отношению к 30 дню, но сравнительно с контролем выше на 45 %. В эти же сроки в красных мышцах сеголеток карпа наблюдается тенденция к снижению САНП. В отличие от красных мышц в белых САНП в среде с ионами кадмия ниже контроля на 14,3%.



Пребывание воблы до 40 дней в среде с кадмием приводит тоже к снижению САНП во всех тканях по отношению к 30 дню, за исключением белых мышц в которых, САНП продолжает повышаться на 40 день интоксикации (выше контроля в 2 раза).

Результаты наших исследований показывают, что при интоксикации ионами кадмия максимальная активность катепсина Д в тканях карпа и воблы приходится на 5, 15 дни эксперимента. Наиболее выраженные изменения в динамике активности катепсина Д наблюдаются у карпа и воблы в кишечнике, красных и белых мышцах. В отличие от катепсина Д суммарная активность нейтральных протеаз в кишечнике у карпа и во всех тканях у воблы повышается и на 30 день интоксикации, кроме того рост САНП в белых мышцах воблы продолжается и к 40 дню.

Повышение активности катепсина Д на начальных этапах интоксикации можно рассматривать как результат закисления среды и лабильзации лизосомальных мембран под воздействием исследуемого токсиканта. Последующее снижение активности катепсина Д при пролонгировании в среде с кадмием, видимо, связано с включением регуляторных механизмов защиты лизосомальных мембран, хотя не исключено, что более длительное воздействие токсиканта привело бы к необратимым процессам в организме.

Одним из проявлений биологического значения повышения активности протеаз может быть усиленный протеолиз дефектных (поврежденных) белковых структур, возникающих в результате воздействия токсикантов [5].

Аналогичный эффект был показан при изучении влияния различных концентраций ионов цинка, аммония, и некоторых других веществ на активность катепсина Д в тканях, икре и личинках рыб [17,12].

При длительной интоксикации ионами кадмия выявлена достаточно четкая активация нейтральных протеаз, во всех тканях исследуемых рыб.

Как нам известно, существенный вклад в суммарную активность нейтральных протеаз вносят кальпаины. Они выполняют в разных тканях животных общие регуляторные функции, и поэтому неконтролируемое повышение активности этих ферментов может иметь фатальные последствия для организма [18]. Действие тяжелых металлов на тканевом уровне часто сопровождается явлением цитотоксичности, связанным с гибелью клеток путем некроза или апоптоза, а в этих процессах, как известно, кальпаины играют ключевую роль [3].

Результаты, полученные в ходе данного исследования, подтверждают участие катепсина Д и нейтральных протеаз в развитии ответной реакции организма на действие тяжелых металлов. Можно предположить, что катепсин Д и нейтральные протеазы участвуют в процессах адаптации организма рыб на уровне внутриклеточного метаболизма, обеспечивая тем самым его устойчивость к изменяющимся условиям среды.

Выводы.

1. Показано, что при хроническом воздействии ионов кадмия происходит достоверная активация катепсина Д и нейтральных протеаз, в тканях исследуемых рыб.

2. В развитии ответной реакции организма на действие хлорида кадмия принимают участие катепсина Д и нейтральные протеазы. Повышение активности ферментов протеолиза, по - видимому, связано с активацией защитных функций клетки.

3. Высокая чувствительность протеолитических ферментов к действию тяжелых металлов может, служит дополнительным тестом для биоиндикации водной среды, и для оценки состояния гидробионтов при нормировании антропогенной нагрузки на водоемы.

Библиографический список

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Биохимия. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1988. – 239с.
2. Алиновская Ю.Б. Восстановление некоторых физиологических показателей карпа после отравления ионами кадмия / Тез. докл. Всеросс. конфер. молодых ученых «Рыбохозяйственная наука на пути в XXI век» Владивосток, ТИНРО-Центр 21-23 мая 2001. – С.4-6.
3. Бондарева Л.А., Немова Н.Н. Внутриклеточная Ca^{2+} – зависимая протеолитическая система животных. – М.: Наука, 2006. – 294 с.
4. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образоват. журн. Биология, 1998. Т.7. № 5. – С. 23-29.
5. Волошина Г. Э. Экологическая оценка состояния поверхности вод реки Понура // Эколог. вест. Север. Кавказа, 2006. Т.2. № 1. – С.118-122.
6. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомальные и лизосомальные ферменты рыб. – Москва: Наука, 2008. – 282 с.
7. Лакин В. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 300 с.
8. Леонова Г.А. Биогеохимическая индикация загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами. // Водные ресурсы (качество и охрана вод, экологические аспекты). – 2004. – Т. 31. – №2. – С. 215-222.
9. Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1996. – С 56-70.



10. Немова Н.Н. Эколого-биохимическое тестирование водоемов по состоянию рыб / Н.Н. Немова, Р.У. Высоцкая, В.С. Сидоров // Научные аспекты экологических проблем России. – М.: Наука, 2002. Т.1. – С. 215-220.
11. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 216 с.
12. Немова Н.Н., Крупнова М.Ю. Лизосомальные протеолитические ферменты – один из критериев оценки физиолого-биохимического состояния рыб. Труды научной конференции Калининград, 2005. – С.116-117.
13. Нурмагомедова П.М., Березин В.А., Эмирбеков Э.З., Рева А.Д. Влияние гипотермии на субклеточное распределение и некоторые физико-химические свойства катепсина D в головном мозгу крыс // Укр. биох. журн. – 1983. – Т. 55, №2. – С 175 – 178.
14. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Усп. совр. биол, 2003. – Т. 123. – № 4. – С. 391-400.
15. Руднева И.И. Оценка последствий хронического антропогенного загрязнения Черного моря с помощью биомаркеров рыб // Тезисы докл. IX съезда гидробиол. общ-ва РАН. – Т.2., Тольятти, 18-22 сент. – 2006. – С. 124.
16. Сидоров В.С., Немова Н.Н., Высоцкая Р.У., Феклов Ю.А. Использование интегрального биохимического индекса при определении предельно допустимых концентраций промышленных токсикантов // Прикладная биохимия и микробиология, 2002. Т.38. №2. – С. 345-350.
17. Чекунова М.П., Фролова А.Д. Роль лизосом в токсикологии металлов // Тез. докл. 3-го всеююз. симпоз. «Структура и функции лизосом». – Тбилиси, 1986. – С. 228-229.
18. Suzuki K., Imajoh S., Emori Y., Kawasaki H., Minami Y., Ohno S. Regulation of activity of calpain // Adv. Enzymol. Regul., 1988. V.27. – P. 153-169.

Bibliography

1. Aleinikova T., Rubtsova G.V. Biochemistry. Guide to practical training in biological chemistry. - M.: Higher school, 1988. p. - 239c.
2. Alinovskaya U.B. The restoration of some physiological indicators of carp after the poisoning of cadmium ions proc. All-Russian confer. of young scientists Fisheries science on the way to the XXI centuryk Vladivostok TINRO-Center 21-23 may 2001. - P. 4-6.
3. Bondareva L.A., Nemova N.N. Intracellular CA²⁺ - dependent proteolytic system of animals. - M.: Nauka, 2006. - p. 294.
4. Budnikov G.K. Heavy metals in environmental monitoring of water systems // Soros educat., Sib. Biology, 1998. Vol. 7. № 5. - With. P. 23-29.
5. Voloshina G. E. The ecological estimation of the surface water of the river Ponura // Ecolog. West. The North. The Caucasus, 2006. Vol. 2. № 1. - P.118-122.
6. Vysotskaya R.U., Nemova N.N. Fish lysosomal and lysosomal enzymes. - Moscow: Nauka, 2008. – p. 282.
7. Lakin B. Biometrics. - M.: Higher school, 1990. – p. 300.
8. Leonov G.A. The biogeochemical indication of pollution of the aquatic ecosystems of the heavy metals. / Water resources quality and water protection ecological aspects. - 2004. - Vol. 31. - 2. - With. - P.215-222.
9. Nemova N.N. Intracellular proteolytic enzymes in fish. - Petrozavodsk: Karelian research centre of RAN, 1996. - With -P. 56-70.
10. Nemova N.N. The ecological-biochemical testing of water bodies as fish / N.N. Nemova, R.W. Vysotskaya, V.S. Sidorov // Scientific aspects of environmental problems in Russia. - M.: Nauka, 2002. Vol.1. - With. – P. 215-220.
11. Nemova N.N., Vysotskaya R.U. Biochemical status display fish. - M.: Science, 2004. – p. 216 p.
12. Nemova N.N., Krupnova M.U. Lysosomal proteolytic enzymes are one of the criteria for the evaluation of physiological and biochemical status of fish. Proceedings of the conference of Kaliningrad, 2005. - P.116-117.
13. Nurmagomedova P.M., Berezin V. a., Emirbekov E.Z., Reva A.D. The impact of hypothermia on distribution and some physico-chemical properties of cathepsin D in the brain of rats // Ukr. biochem., Sib. - 1983. - Vol. 55, №2. - P 175 - 178.
14. Rudneva I.I. Eco-physiological features of the antioxidant system of fish and processes of lipid peroxidation // Russ modern biology, 2003. - Vol. 123. - № 4. - With. – P. 391-400.
15. Rudneva I.I. The assessment of the effects of chronic anthropogenic government-of the Black sea with the help of biomarkers of fish // Abstracts. IX Congress of hidrobiol. the company RAN. - Vol.2., Togliatti, 18-22 Sept. - 2006. - With. – p. 124.
16. Sidorov V.S., Nemova N.N., Vysotskaya R.U., Feklov U.A. The use of integral biochemical index in determining the maximum allowable concentration of industrial toxicants // Applied biochemistry and Microbiology, 2002. Vol.38. №2. - With. – P. 345-350.
17. Chekunova M.P., Frolov A.D. The role of the lysosomes of the toxicology of metals // Tez. Dokl. 3-th colloquia math. «The structure and function of lysosomes of the». - Tbilisi, 1986. - With. – P. 228-229.
18. Suzuki K., Imajoh S., Emori Y., H. Kawasaki, Minami Y., Ohno S. Regulation of activity of calpain // Adv. Enzymol. Regul., 1988. V.27. - P. 153-169.