

Белковые спектры печени живородки речной в норме и при интоксикации ионами свинца (II)

© 2019. Т. С. Дроганова, ст. преподаватель,
Л. В. Поликарпова, н. с., А. С. Коницев, д. б. н., профессор, с. н. с.,
Московский государственный областной университет,
141014, Россия, Московская обл., г. Мытищи, ул. Веры Волошиной, д. 24,
e-mail: ecolab@mgou.ru

В статье рассмотрены некоторые аспекты метаболических изменений у гидробионтов в результате сублетального токсического воздействия. В остром токсикологическом эксперименте исследовано воздействие катионов Pb^{2+} на активность кислой фосфатазы (КФ), кислой ДНКазы живородки речной. Впервые выявлены изменения в спектре растворимых белков печени моллюска под воздействием тяжёлых металлов, а также определены молекулярные массы белков. На протяжении исследованного периода экспозиции (96 ч) с токсикантами выявлены колебательные изменения в удельной активности ферментов по сравнению с контрольной группой моллюсков. Характер изменения активности ферментов указывает на адаптационные процессы в организме моллюсков. Максимальный прирост активности наблюдается в первые сутки экспозиции, после чего практически не наблюдается отличий между контрольной и опытной группами. Сходные результаты были обнаружены для ДНКазы. Мы предполагаем, что повышение удельной активности ферментов связано с разрушением эндогенного ингибитора нуклеаз и фосфатаз. В спектрах растворимых белков, начиная с 6–12 ч экспозиции, обнаружено появление белковых фракций, индуцированное токсическим воздействием. Среди данных белков, вполне вероятно, присутствуют металлотioneин-подобные протеины. При электрофорезе с SDS обнаружены полипептиды с молекулярной массой 11–20 кДа, что соотносится с молекулярной массой металлотioneинов беспозвоночных животных. Полученные нами данные свидетельствуют о глубокой перестройке в наборах белков печени живородки речной при интоксикации ионами Pb^{2+} .

Ключевые слова: живородка речная, токсическое воздействие, белки, ферменты, металлотioneины.

River snail liver protein spectrum in normal conditions and when intoxicated with lead (II) ions

© 2019. T. S. Droganova ORCID: 0000-0002-8917-7392
L. V. Polikarpova ORCID: 0000-0002-5459-3054, A. S. Konichev ORCID: 0000-0002-7074-805X
Moscow State Regional University,
24, Very Voloshinoy St., Mytishi, Moscow region, Russia, 141014,
e-mail: ecolab@mgou.ru

Several aspects of metabolic changes of hydrobionts as a result of sublethal toxic effect are described in the current article. In an acute toxicological experiment, the effect of the Pb^{2+} cations on the activity of acid phosphatase, and acid DNase. Changes in the spectrum of soluble liver proteins of the river snail by exposure to heavy metals are detected for the first time. The molecular masses of proteins were determined. During the investigated period of exposure (96 h) with toxicants, changes in the specific activity of enzymes were revealed in comparison with the control group of mollusks. The nature of changes in enzyme activity indicates the adaptation processes in the snail's body. The maximum increase of acid phosphatase activity is observed in the first day of exposure, after the values practically do not differ from the control. Similar results were obtained for the acid DNase. We assume that the increase in the specific activity of enzymes is associated with the destruction of the endogenous inhibitor of DNase and phosphatases. In the spectra of soluble proteins, starting from 6–12 hours of exposure, the appearance of protein fractions induced by toxic effects was found. Based on the analysis of protein spectra we determined that among these proteins, it is likely that metallothionein-like proteins are presented. During electrophoresis in denaturing conditions with SDS, a polypeptide with a molecular mass of 11 kDa was found, which correlates with the molecular weight of animals' metallothioneins. The data we obtained indicate a profound reorganization of snail's liver protein sets during toxic effect of Pb(II).

Keywords: river snail, toxic effects, proteins, enzymes, metallothioneines.

Многие токсические вещества могут длительное время сохраняться в воде, накапливаться в донных отложениях и гидробион-

тах. Такой способностью обладают тяжёлые металлы (ТМ), хлорорганические пестициды и др.

В числе других ТМ свинец извлекается из донных отложений и накапливается гид-робионтами [1]. Повышение содержания свинца в открытых водоёмах связано с выбросами автотранспорта, выносом в водные объекты сточных вод рудообогатительных фабрик, металлургических и металлообрабатывающих заводов, химических производств и др. [2].

Известно, что соединения свинца нарушают обмен веществ, изменяя структуру внутриклеточных мембран, затрудняют образование вторичной структуры белков и являются ингибиторами некоторых ферментов, связываясь с остатками цистеина в HS-содержащих ферментах [3]. Также ионы Pb^{2+} образуют устойчивые комплексы с карбонильными и фосфатными группами белков, тем самым нарушая их нормальный метаболизм. С другой стороны, ТМ являются индукторами синтеза специфических защитных белков – металло-тионеинов [4]. Ранее было изучено воздействие ряда ТМ на активность протеаз, фосфатаз и рибонуклеаз моллюсков [5–7], тогда как изменения в наборах растворимых белков моллюсков под воздействием ТМ долгое время оставались не изучены в связи со сложностью их фракционирования и выявления.

Ранее нами были отработаны условия выявления спектров растворимых белков моллюсков при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) и установлены происходящие в них изменения под воздействием фторсодержащих соединений [8] в связи с возрастанием их содержания в поверхностных водах [9], а также предложены подходы к определению молекулярных масс выявленных белков [10].

Целью данной работы стал анализ изменений активности ферментов, играющих важную роль в метаболизме моллюсков, а также спектров растворимых белков живородки речной под влиянием ионов свинца.

Материалы и методы

Материал. Материалом для исследования стали пресноводные моллюски живородка речная (*Viviparus viviparus* L.), ввиду их широкого распространения в водоёмах Европейской части России. Данный вид моллюсков характеризуется широкими возможностями для метаболической адаптации к токсическому воздействию [6–8].

Сбор моллюсков живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) проводили в прибрежной зоне реки Вязь Пушкинского района Мо-

сковской области. Акклимацию проводили в течение 2-х недель в аквариуме при температуре, близкой к естественной, с постоянной аэрацией.

Токсикологический эксперимент. Контролем служили особи, содержащиеся в воде без добавления токсиканта при прочих равных условиях в течение тех же временных интервалов. В качестве токсиканта использовали ацетат свинца в концентрации 0,1 мг/л по катиону Pb^{2+} , что соответствует величине 10 ПДК_{вод.} (ПДК_{вод.} составляет 0,01 мг/мл). Выбор концентрации токсиканта обусловлен целью исследования – в более ранних работах установлено, что концентрация, соответствующая 10 ПДК, оптимальна для изучения острого токсического воздействия. При меньшем содержании действующего вещества может не наблюдаться яркого, наглядного результата, а повышенная концентрация зачастую приводит к преждевременной гибели особей [5]. Экспозиция опыта составляла от 2 до 96 ч, при этом было использовано около 150 особей моллюсков. По истечении установленного времени отбирали группы по 5–6 животных и извлекали пищеварительную железу, из которой получали экстракт водорастворимых белков [8]. Все измерения проводились в трёх повторностях. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Лоури [11].

Определение активности кислой фосфатазы и кислой ДНКазы. Активность кислой фосфатазы (КФ) определяли традиционным методом по скорости гидролиза модельного субстрата *p*-нитрофенилфосфата [12].

Активность дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) определяли по скорости гидролиза синтетического олигонуклеотида, меченого парой флуорофоров – репортером и тушителем (аналогично зондам типа TaqMan) по самостоятельно разработанной методике [13].

Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах на 1 мг белка (Е/мг белка). Значения активности, полученные для контрольной группы животных, принимали за единицу для более наглядного представления результатов исследования.

Диск-электрофорез. Электрофорез белков проводили в колонках ПААГ по Девису при 4–6 °С. Условия электрофореза были оптимизированы нами специально для исследуемого объекта и детально описаны ранее [8].

Определение молекулярных масс белков. Белки фракционировали при помощи усовершенствованного метода электрофореза в денатурирующих условиях [10]. Молекуляр-

ную массу белковых фракций определяли по калибровочной кривой, маркерными белками служили каталаза печени быка (240 кДа), альдолаза мышц кролика (160 кДа), бычий альбумин (67 кДа), цитохром С (12,3 кДа) и динитрофенилаланин (255 Да).

Результаты и обсуждение

Исследование показало изменение активности КФ и ДНКазы под воздействием ионов свинца(II) (рис. 1), что согласуется с литературными данными об увеличении активности гидролаз у гидробионтов под влиянием токсикантов [14, 15]. Важно отметить, что активность ферментов не остаётся постоянной на протяжении экспозиции ни в одной из групп животных, вследствие естественных метаболических процессов в организме моллюсков. Максимальный прирост активности КФ наблюдается в первые сутки экспозиции, после чего значения практически не отличаются от контрольных, что, вероятно, связано с адаптивными реакциями животных к токсическому воздействию.

Сходные результаты были получены нами и для кислой ДНКазы. Хорошо заметно значительное увеличение активности в интервале экспозиции от 24 до 60 ч, в дальнейшем показатели также сближаются с контрольными. Выявленный характер изменений в активности ДНКазы практически идентичен таковому в отношении кислой РНКазы печени моллюсков [7], что подразумевает сходный механизм реакции нуклеаз моллю-

ска на воздействие свинца. Следует учесть, что ранее нами была выявлена активация протеолитических ферментов в печени живородки речной под воздействием высоких концентраций свинца в первые сутки экспозиции [6], что может приводить к разрушению эндогенного ингибитора ДНКаз и фосфатаз, приводить к распаду комплекса фермент-ингибитор и повышать удельную активность ферментов.

Важные данные были получены нами при исследовании состава нативных белков пищеварительной железы живородки речной (рис. 2). Так, воздействие Pb^{2+} привело к появлению целой группы белковых фракций, отсутствующих в контроле и характеризующихся средней и высокой электрофоретической подвижностью. Наиболее высокоподвижный (низкомолекулярный) белок выявляется с 6 ч до конца экспозиции. Одновременно наблюдается исчезновение высокомолекулярных белковых фракций. Распад высокомолекулярных белков на фоне увеличения протеолитической активности ранее был установлен при воздействии ионов кадмия. Высокой подвижностью при электрофорезе отличаются протеолитические ферменты печени моллюсков [7].

Заключение

Совокупность полученных данных позволяет предположить следующий механизм воздействия свинца, а также, возможно, и других ТМ на метаболизм моллюсков. В начальные часы воздействия свинца происходит



Рис. 1. Изменение удельной активности ферментов в норме и при интоксикации ионами Pb(II)
 Fig. 1. Change of enzymes specific activity in norm and in intoxication by Pb²⁺

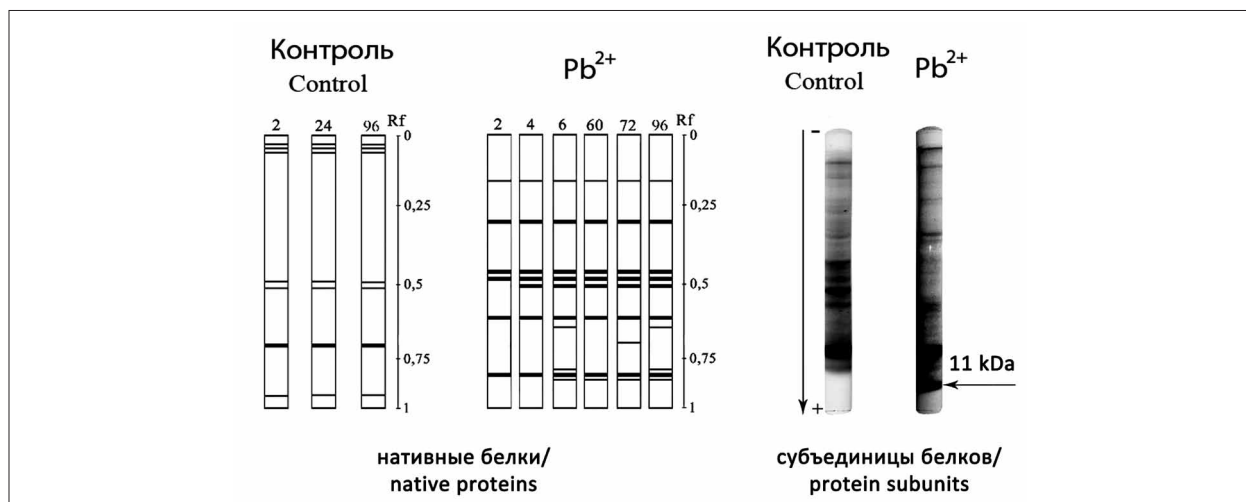


Рис. 2. Электрофореграммы белков из пищеварительной железы живородки речной в норме и при воздействии свинца (II); Rf – относительная электрофоретическая подвижность; 2–96 – время экспозиции с токсикантом (ч)

Fig. 2. Electrophoregrams of hepatopancreas proteins of the river snail in norm and under the influence of Pb²⁺. Rf is relative electrophoretic mobility. Numbers 2–96 indicate the exposure time under the influence of toxicant

Примечание: В контрольной группе особей на протяжении всей экспозиции белковые спектры не изменялись. В группе, находившейся под воздействием Pb²⁺, от 6 до 24 ч экспозиции и от 36 до 60 ч экспозиции были получены одинаковые белковые спектры / Note: In the control group throughout the entire exposure protein spectra did not change. In the group exposed to Pb²⁺ from 6 to 24 hours and from 36 to 60 hours of exposure the same protein spectra were obtained.

разрушение предсуществующего комплекса фермент-ингибитор, что сопровождается распадом высокомолекулярных белков (или их комплексов), и, одновременно, появляются белки со средней и высокой электрофоретической подвижностью. При этом резко увеличивается активность ДНКазы и фосфатазы. Начиная с 6–12 ч экспозиции, накопление свинца в организме моллюсков может вызывать индукцию синтеза группы стрессовых белков, среди которых, вполне вероятно, синтезируются металлотионеинподобные протеины. При электрофорезе с SDS это проявляется в виде полипептида с молекулярной массой 11 кДа (рис. 2), что согласуется с данными по молекулярным массам металлотионеинов беспозвоночных животных [5, 16, 17]. Эти белки начинают активно связывать катионы свинца, и тем самым вновь открывается возможность для нормализации активности ДНКазы и фосфатазы.

Изложенная последовательность событий представляется нам вполне логичной и заслуживает более детального рассмотрения в последующих работах.

Литература

1. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжёлые металлы в пресноводных водах: Контроль и оценка влияния. М.: Мир, 1987. 288 с.

2. Gorinstein S., Jung S.T., Moncheva S., Arancibia-Avila P., Park Y.S., Kang S.G., Goshev I., Trakhtenberg S., Namiesnik J. Partial characterization of proteins from mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of contamination // *Arcg. Environ. Contam. Toxicol.* 2005. V. 49. No. 4. P. 504–510.

3. Burlando B., Bonomo M., Capri F., Mancinelli G., Pons G., Viarengo A. Different effects of Hg²⁺ and Cu²⁺ on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca²⁺-ATPase: Hg²⁺ induction of protein expression // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2004. V. 139. No. 4. P. 201–207.

4. Вредные химические вещества (Неорганические соединения I–IV групп) / Под ред. В.А. Филова. Л.: Химия, 1988. 592 с.

5. Цветков И.Л., Коничев А.С. Биохимические и молекулярно-генетические аспекты адаптации гидробионтов. М.: Изд-во МГОУ, 2013. 122 с.

6. Конин Д.Н., Коничев А.С. Влияние ионов тяжёлых металлов на протеолитическую активность в печени моллюсков *Viviparus viviparus* L. // *Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки.* 2007. № 1. С. 3–6.

7. Филков П.В., Коничев А.С. Изменение активности РНКаз моллюска живородка речная (*Viviparus viviparus*) при отравлении тяжёлыми металлами // *Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки.* 2007. № 1. С. 12–17.

8. Дроганова Т.С., Коничев А.С., Петренко Д.Б., Поликарпова Л.В., Цветков И.Л. Влияние фторида натрия и фторуксусной кислоты на активность кислой ДНКазы, кислой фосфатазы и спектр растворимых белков гепатопанкреаса живородки речной // *Вестник Московского государственного*

ного областного университета. Серия: Естественные науки. 2017. № 4. С. 36–45.

9. Петренко Д.Б., Гладнева О.А., Ворончихина К.А., Васильев Н.В. Содержание фторид-ионов в поверхностных водах урбанизированных территорий Московского региона // Теоретическая и прикладная экология. 2017. № 3. С. 65–72.

10. Дроганова Т.С., Поликарпова Л.В., Коничев А.С. Усовершенствованный метод фракционирования белков моллюсков при электрофорезе в денатурирующих условиях // Проблемы региональной экологии. 2018. № 2. С. 65–67.

11. Lowry O.H., Rosenbrought N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. No. 2. P. 265–275.

12. Heinonen J.K., Lahti R.A. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. 1981. V. 113. No. 2. P. 313–317.

13. Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Коничев А.С. Новый метод количественного определения активности дезоксирибонуклеазы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в качестве субстрата // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2012. № 3. С. 46–51.

14. Etxeberria M., Sastre I., Cajaraville M.P., Marigomez I. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 27. P. 338–345.

15. Au D.W. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review // Mar. Pollut. Bull. 2004. V. 48. No. 9–10. P. 817–834.

16. Geret F., Cosson R.P. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2002. V. 42. No. 1. P. 36–42.

17. Dallinger R., Chabicovsky M., Berger B. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomata*. I. Molecular, biochemical, and methodical background // Environ. Toxicol. Chem. 2004. V. 23. No. 4. P. 890–901.

References

1. Moore J.W., Ramamoorthy S. Heavy metals in natural waters. Moskva: Mir, 1987. 288 p. (in Russian).

2. Gorinstein S., Jung S.T., Moncheva S., Arancibia-Avila P., Park Y.S., Kang S.G., Goshev I., Trakhtenberg S., Namiesnik J. Partial characterization of proteins from mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of contamination // Arcg. Environ. Contam. Toxicol. 2005. V. 49. No. 4. P. 504–510.

3. Burlando B., Bonomo M., Capri F., Mancinelli G., Pons G., Viarengo A. Different effects of Hg^{2+} and Cu^{2+} on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca^{2+} -ATPase: Hg^{2+} induction of protein expression // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2004. V. 139. No. 4. P. 201–207.

4. Harmful chemicals (Inorganic compounds of Groups I–IV) / Ed. V.A. Filov. Leningrad: Khimiya, 1988. 592 p. (in Russian).

5. Tsvetkov I.L., Konichev A.S. Biochemical and molecular genetic aspects of adaptation of hydrobionts: monograph. Moskva: Izd-vo MGOU, 2013. 122 p. (in Russian).

6. Konin D.N., Konichev A.S. Effect of heavy metal ions on proteolytic activity in the liver of mollusks *Viviparus viviparus* L. // Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki. 2007. No. 1. P. 3–6 (in Russian).

7. Filkov P.V., Konichev A.S. The change in the activity of the *Viviparus viviparus* mollusk RNase from poisoning with heavy metals // Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki. 2007. No. 1. P. 12–17 (in Russian).

8. Droganova T.S., Konichev A.S., Petrenko D.B., Polikarpova L.V., Tsvetkov I.L. Influence of sodium fluoride and fluoroacetic acid on the activity of acidic DNase, acid phosphatase and the spectrum of soluble proteins of *Viviparus viviparus* L. // Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki. 2017. No. 4. P. 36–45 (in Russian).

9. Petrenko D.B., Gladneva O.A., Voronchikhina K.A., Vasiliev N.V. Content of fluoride ions in surface waters in urbanized territories of the Moscow region // Theoretical and Applied Ecology. 2017. No 3. P. 65–72 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-3-065-072

10. Droganova T.S., Polikarpova L.V., Konichev A.S. The improved method of fractionating fresh-water mollusks based on the electrophoretic separation under denaturing conditions // Regional environmental issues. 2018. No. 2. P. 65–67 (in Russian). doi: 10.24441/1728-323X-2018-12065

11. Lowry O.H., Rosenbrought N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. No. 2. P. 265–275.

12. Heinonen J.K., Lahti R.A. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. 1981. V. 113. No. 2. P. 313–317.

13. Tsvetkov I.L., Polikarpova L.V., Konichev A.S. A new method for quantitative determination of deoxyribonuclease activity using fluorophore labeled oligonucleotides as a substrate // Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki. 2012. No. 3. P. 46–51 (in Russian).

14. Etxeberria M., Sastre I., Cajaraville M.P., Marigomez I. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1994. V. 27. P. 338–345.

15. Au D.W. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review // Mar. Pollut. Bull. 2004. V. 48. No. 9–10. P. 817–834.

16. Geret F., Cosson R.P. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2002. V. 42. No. 1. P. 36–42.

17. Dallinger R., Chabicovsky M., Berger B. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomata*. I. Molecular, biochemical, and methodical background // Environ. Toxicol. Chem. 2004. V. 23. No. 4. P. 890–901.