

Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря.
Материалы IX международной конференции
11-14 октября 2004 г., Петрозаводск, Карелия, Россия
Петрозаводск, 2005. С. 47-50.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ АМФИПОД БЕЛОГО МОРЯ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

В.В. БОГДАН¹, Н.Н. НЕМОВА¹, Т.Р. РУОКОЛАЙНЕН¹, Г.А. ШКЛЯРЕВИЧ²

¹ Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

² Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

Исследовали изменения липидного, фосфолипидного и жирнокислотного состава литоральных амфипод из различных по загрязненности районов Белого моря. Показаны общие и специфические особенности в изменении указанных показателей относительно контроля при действии разных типов токсикантов. Отмечена адаптивная направленность липидного обмена при действии смеси токсикантов и веществ органической природы. Показано дестабилизирующее действие нефтепродуктов на липидный состав мембран.

V.V. Bogdan, N.N. Nemova, T.R. Ruokolainen & G.A. Shklyarevich. Lipid composition in amphipods from the White Sea under various types of anthropogenic influence // The study, sustainable use and conservation of natural resources of the White Sea. Proceedings of the IXth International Conference, October, 11-14, 2004. Petrozavodsk, Karelia, Russia. Petrozavodsk, 2005. P. 47-50.

Variability of lipid metabolism indices such as total lipids content, phospholipid content and their fatty acid compositions in amphipods from some littoral sites of the White Sea with different levels of anthropogenic contamination was investigated. General and specific differences in the dynamics of indicated parameters comparing to the control values under effects of various contaminant types were shown. An adaptive trend in lipid turnover alteration under the effect of complex mixture of toxicants and organic compounds was observed. Certain instability in membrane lipid composition at oil products contamination was indicated.

В последние годы изучение биологических ресурсов Белого моря особенно актуально в связи с изменением стабильности его экосистемы вследствие интенсивного антропогенного воздействия в условиях низких температур. Кандалакшская губа Кандалакшского залива испытывает значительный прессинг от ежегодного ливневого стока более чем 2 тысяч тонн загрязняющих веществ различной природы (нефтяные углеводороды, органические вещества, фенолы и тяжелые металлы) (Мискевич, Чугайнова, 2001). На водоем обычно действует целый комплекс факторов, поэтому натурные исследования эффектов воздействия токсикантов являются более объективными, чем модельные.

Показано, что для оценки загрязнения морских экосистем Севера наиболее информативными и удобными объектами являются макробеспозвоночные (Погребов, 2001). Многолетние межгодовые исследования сообществ литорального макрозообентоса в Кандалакшском заливе Белого моря показывают наличие резких флюктуирующих тенденций различных направлений основных количественных показателей. Это явление особенно четко наблюдается у беломорских литоральных амфипод, обладающих широкой экологической пластичностью, коротким жизненным циклом и довольно высокой плодовитостью (Фауна ..., 2003).

Для оценки эффектов загрязнения водных экосистем используются различные методы биологического анализа состояния водных организмов. В по-

следнее время все большее внимание уделяется биохимическим исследованиям, которые позволяют глубже понять механизмы адаптивного ответа организмов на действие различных стресс-факторов и наблюдать изменения в обмене веществ в организме, наступающие, как правило, до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы.

Учитывая вышесказанное, изучали изменения липидного и жирнокислотного составов у амфипод при токсическом воздействии комплексного бытового и промышленного загрязнения Кандалакшского залива Белого моря.

Материалы и методы

Объектом исследования служили амфиподы (*Amphipoda: Crustacea*), в основном (до 90%) представители вида *Lagunogammarus oceanicus* (Sege-stale, 1974), выловленные осенью на литорали некоторых районов Кандалакшского залива Белого моря, загрязненных различными токсикантами. В районе Лупчь-острова отмечено комплексное загрязнение органическими и неорганическими веществами, в частности, тяжелыми металлами, и частично нефтепродуктами. Литораль в зоне механического завода (г. Кандалакша) сильно загрязнена токсикантами органической природы. Преимущественное действие нефтепродуктов отмечено в акватории Малого острова. Контролем служили особи из сравнительно чистой зоны Белого моря (Турий мыс).

Липиды экстрагировали из зафиксированных сборных проб амфипод (30 экз.) смесью хлороформа с метанолом (2:1) (Кейтс, 1975). Фракционирование липидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» в системе растворителей: петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90:10:1). Количественно липидные фракции определяли гидроксаматным методом (Сидоров и др., 1972). Холестерин определяли по реакции с цветным реагентом (Engelbrecht, 1974). Разделение основных классов фосфолипидов осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Arguini et al., 1996).

Метилловые эфиры жирных кислот общих липидов получали прямым метилированием в абсолютном метаноле, содержащем 8% хлористого ацетила (Цыганов, 1971), и анализировали на газофазном хроматографе «Хром-41» на полярной фазе – 15%-ный Reoplex-400 на Хроматоне N-AW-DMCS в изотермическом режиме при 190°C. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением со временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными (Jamieson, 1975). Относительное содержание отдельных кислот определяли по Бартлетту и Айверсону (Bartlett, Iverson, 1966) и рассчитывали в процентах от суммы всех жирных кислот.

Результаты

Результаты анализа липидов показали определенные изменения в содержании общих липидов и отдельных липидных фракций у амфипод под влиянием загрязнителей разной природы (Рис. 1). Количество общих липидов при расчете к сухому веществу оказалось в 1,3 раза выше при действии органических веществ и незначительно увеличилось под влиянием смеси токсикантов. При преимущественном действии нефтепродуктов наблюдалось снижение количества общих липидов относительно контроля.

Уровень фосфолипидов под влиянием органических веществ и смеси токсикантов оказался в 1,8 и 1,4 раза выше по сравнению с чистой зоной. При нефтяном загрязнении содержание фосфолипидов было наименьшим, составляя 85% от контроля. Уровень холестерина оказался выше при всех токсических воздействиях, особенно при комбинированном загрязнении. Что касается запасных липидов: триацилглицеринов и эфиров холестерина, то их суммарное содержание было меньше во всех изученных вариантах (Рис. 1). При этом уровень эфиров холестерина снижался относительно контроля, особенно значительно при комбинированном загрязнении. Содержание триацилглицеринов превысило контрольные значения при действии органики и смеси токсикантов (на 50% и 30% соответственно). Минимальное увеличение (на 6%) отмечено при нефтяном воздействии.

Анализ мембранных липидов показал изменения в соотношениях индивидуальных фосфолипидов при разных типах воздействия по сравнению с чистой зоной (Рис. 2). Относительное содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭА) уменьшалось во всех вариантах опыта, но более существенно при нефтяном загрязнении. Повышение уровня лизофосфатидилхолина (ЛФХ) было наибольшим при комбинированном воздействии на фоне снижения содержания фосфатидилхолина (ФХ). При нефтяном загрязнении также наблюдалась тенденция к уменьшению концентрации фосфатидилхолина. Под влиянием органики и смеси веществ относительное содержание сфингомиелина (СФМ) снижалось, в то время как нефтяное загрязнение вызывало повышение его концентрации. Органическое загрязнение существенно увеличивало содержание фосфатидилсерина (ФС) по сравнению с контролем, наряду с которым при нефтяном загрязнении повысился и уровень фосфатидилинозитола (ФИ). Концентрация кардиолипина (КЛ) была выше у опытных амфипод, особенно при действии веществ органической природы.

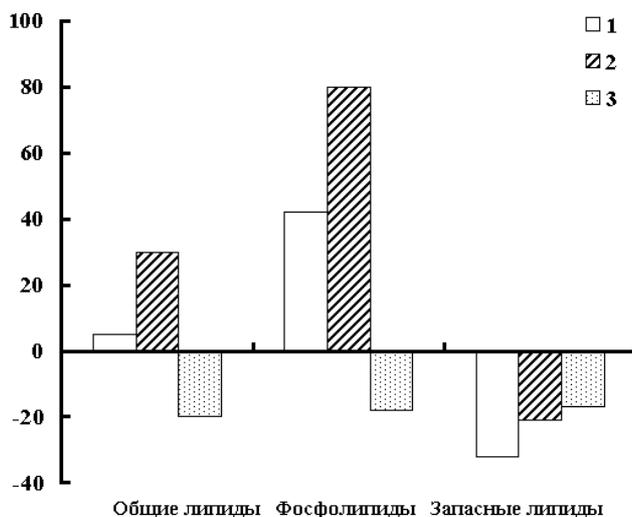


Рис. 1. Изменение липидного состава амфипод (в % к контролю) при разных типах токсического воздействия

1- комбинированное, 2- органическое, 3-нефтяное

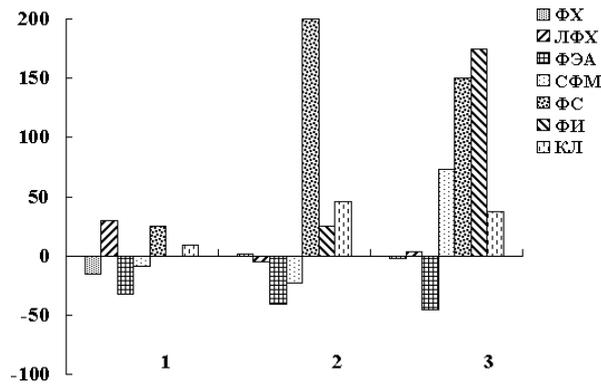


Рис. 2. Изменение состава индивидуальных фосфолипидов (в % к контролю) при разных типах токсического воздействия
1- комбинированное, 2- органическое, 3- нефтяное

Результаты исследования жирнокислотного состава общих липидов показали, что амфиподы из всех загрязненных районов содержали меньше насыщенных кислот, чем контрольные. Воздействие органических веществ приводило к некоторому увеличению доли ненасыщенных длинноцепочечных кислот. Смесь токсикантов вызывала повышение уровня моноеновых кислот при неизменном содержании полиеновых кислот в липидах относительно контрольных значений. При действии нефтепродуктов доля полиеновых кислот в липидах амфипод оказалось несколько меньше, чем в контроле. Следует отметить, что во всех исследуемых вариантах альтерации в содержании отдельных кислот составляли в среднем 2-4%. Известно, что для модификации свойств мембраны важна не величина отклонений от нормы, а направленность изменений (Бурлакова, 1977).

Обсуждение

Анализ исследованных показателей липидного обмена у амфипод показал специфические различия в содержании структурных и запасных компонентов клеток при разных типах загрязнителей. При сильном загрязнении органическими веществами отмечено увеличение количества фосфолипидов - функциональных компонентов мембран. Незначительное повышение концентрации фосфолипидов наблюдалась под влиянием смеси токсикантов. Подобная адаптивная реакция, связанная с активацией синтеза мембранных липидов, отмечалась у беспозвоночных при загрязнении воды веществами различной природы (Регеранд, 2001). Между тем, при действии нефтепродуктов обнаружено уменьшение содержания фосфолипидов. Ранее отмечалось, что изменения в фосфолипидно-белковом комплексе мембран относятся к числу характерных аномалий, возникающих в клетке под влиянием нефти (Пфайфере, Платипира, 1986). Как показали экспериментальные исследования, из компонентов нефти наибольшее токсическое действие на бокоплавов оказывали полиароматические углеводороды (ПАУ), обладающие максимальной растворимостью (Миронов, 1990). При действии ПАУ в экспериментальных исследованиях обнару-

жено уменьшение линейных размеров амфипод (Михайлова, 2002). Это может быть связано с дефицитом как фосфолипидных, так и белковых компонентов клеточных структур. Следствием обнаруженного нами при нефтяном загрязнении уменьшения мембранных фосфолипидов может быть снижение соматического роста исследуемых беспозвоночных, что считается важным показателем нарушения функционирования морских экосистем.

Во всех опытных вариантах обнаружено уменьшение содержания запасных липидов за счет эфиров холестерина при сохранении триацилглицеринов. Гидролиз эфиров холестерина создает резерв холестерина, необходимого при стрессе для перестройки мембран и обмена веществ в целом (Сидоров, 1983). Снижение уровня эфиров холестерина при соответствующем увеличении концентрации холестерина относительно контроля наиболее выражено при комбинированном загрязнении и менее значительно - при действии нефти.

При изученных токсических воздействиях в мембранных липидах отмечены перестройки, связанные с изменениями в соотношениях индивидуальных фосфолипидов, затрагивающие клеточные и субклеточные структуры. Известно, что отдельные фосфолипиды, как доминирующие, так и минорные, могут выступать в качестве эффекторов и кофакторов различных метаболических процессов (Бурлакова, 1977). Поэтому отклонения их содержания от нормы отражают специфические изменения в различных звеньях метаболизма в клетках в зависимости от типа ксенобиотика.

Адаптивная роль липидов определяется модификациями их жирнокислотных составов с повышением доли высоконасыщенных радикалов. Известно, что ненасыщенные жирные кислоты влияют на физические свойства мембраны, ее проницаемость, транспортные свойства и активность многих мембраносвязанных ферментов (Крепс, 1981). При комбинированном загрязнении практически не обнаружено различий в уровнях жирных кислот по сравнению с контролем, что свидетельствует о более слабом воздействии смеси токсикантов в суще-

ствующих концентрациях на метаболизм жирных кислот. Аналогичные результаты были получены нами при исследовании действия различных тяжелых металлов, нитритов и нитратов на осетровых рыб, когда суммарный токсический эффект оказался ниже ожидаемого аддитивного (Богдан и др., 2001). Следует отметить, что при непродолжительном действии сублетальных доз тяжелых металлов на моллюсков различий в концентрациях жирных кислот в липидах мембранных структур относительно контроля также не было обнаружено (Бельчева, Челомин, 1988). Увеличение доли полиеновых ацилов на фоне существенного повышения уровня фосфолипидов у амфипод при сильном загрязнении органическими веществами должно приводить к повышению ненасыщенности мембранных липидов и их функциональной активности, что обеспечивает биохимические механизмы адаптационного процесса. Негативные изменения в мембранах были более выражены при преимущественном действии на амфипод нефтяного загрязнения, когда на фоне значительного уменьшения содержания фосфолипидов в них был ниже и коэффициент ненасыщенности. Указанные альтерации в липидной компоненте мембран могут приводить к уменьшению проницаемости, изменению активного транспорта ионов, модуляции активности ферментов энергетического обмена и другим негативным эффектам, сопровождающим деструктивные процессы в клетке.

Выводы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии как общих, так и специфических особенностей в ответной реакции метаболизма на уровне липидного обмена у амфипод на воздействие отдельных типов ксенобиотиков. Показано, что под влиянием смеси токсикантов разной природы на фоне увеличения количества общих фосфолипидов отмечалось стабильное соотношение жирных кислот по сравнению с контролем, что позволяет организму поддерживать оптимальный уровень различных биохимических процессов. При преимущественном действии загрязнителей органической природы отмечено увеличение ненасыщенных фосфолипидов, отражающее адаптивную направленность пластического обмена. Дестабилизирующие процессы при действии нефтепродуктов связаны, главным образом, с уменьшением содержания фосфолипидов и уровня полиеновых жирных кислот.

Авторы выражают глубокую благодарность администрации Кандалакиского заповедника за оказанное содействие при сборе полевого материала.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации «Ведущие научные школы» (проект НШ - 894. 2003.4).

Литература

Бельчева Н.Н., Челомин В.П. 1988. Влияние сублетальных доз тяжелых металлов на обмен гидрофобного матрикса мембранных структур клеток жабр морского

двустворчатого моллюска. Владивосток. ДСП ВИНТИ 15.12.88. № 8781-1388.

Богдан В.В., Сидоров В.С., Зекина Л.М. 2001. Липиды рыб при адаптации к различным экологическим условиям // Экологические проблемы онтогенеза рыб: физиолого-биохимические аспекты. М.: МГУ. С. 188-202.

Бурлакова Е.Б. 1977. Влияние липидов мембран на ферментативную активность // Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М.: Наука. С. 16-27.

Кейтс М. 1975. Техника липидологии. М.: Мир. 322 с.

Крепс Е.М. 1981. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 339 с.

Миронов О.Г., Писарева Н.А., Щекатурина Т.Л., Латин Б.П. 1990. Исследование состава аренов в черноморских мидиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) // Гидробиол. журн. Т.26, № 4. С. 59-62.

Мискевич И.В., Чугайнова В.А. 2001. Характеристика загрязнения вод Белого моря в период весна-осень 2000 г. // Проблема изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря. Архангельск: Правда Севера. С. 48-49.

Михайлова Л.В. 2002. Регламентация нефти в донных отложениях пресноводных водоемов // Совр. проблемы водной токсикологии. Борок. С. 117.

Погребов В.Б. 2001. Биоиндикационные возможности бентоса в отношении антропогенного загрязнения морей Российской Арктики и Севера // Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга. Сыктывкар. С. 150-151.

Пфейфере М.Ю., Платинира В.П. 1986. Углеводороды и морская микрофлора // Эксперим. водная токсикология. Рига: Зинатне. Вып. 11. С. 37-43.

Регеранд Т.И. 1995. Изменение липидного обмена некоторых представителей зообентоса р. Кенти под влиянием инфильтрационных вод // Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: ИВПС КНЦ РАН. С. 25-33.

Сидоров В.С. 1983. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука. 240 с.

Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А. 1972. Липиды рыб. I. Методы анализа // Лососевые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск. С. 152-163.

Фауна беспозвоночных Карского, Баренцева и Белого морей (информатика, экология, биогеография). 2003. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН. 385 с.

Цыганов Э.П. 1971. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // Лабораторное дело. №8. С. 490-493.

Arduini A., A. Peschiera, S. Dottori, A. Sciarroni, F. Serafini, M. Calvani. 1996. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. of Lipid Research. V.37. P. 684-689.

Bartlett J., Iverson J.L. 1966. Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // J. Assoc. Office Analytical Chem. Vol. 49, № 1. P. 21-27.

Engelbrecht F.M., Mori F., Anderson I.T. 1974. Cholesterol determination in serum/A rapid direct method // S.A. Med. J. 48. P. 250-256.

Jamieson G.R. 1975. GLC-identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci. Vol. 13, №10. P. 491-497.