

## **ACTION OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES UPON ACETYLCHOLINESTERASE OF FISH BRAIN AND BOVINE ERYTHROCYTES AND SOME ELEMENTS OF ITS ANTYOXIDATIVE DEFENSE**

**G.M. Chuiko, P.A. Gdovskii, V.A. Podgornaya**

IBIW RAS, Borok, Russia  
gko@ibiw.yaroslavl.ru

The action of the reactive oxygen species (ROS) upon acetylcholinesterase (AChE) activity in brain of fish, common carp *Cyprinus carpio* L. and roach *Rutilus rutilus* L., and bovine erythrocytes is studied. It is shown hydrogen peroxide affects AChE activity in dose depended manner. Enzyme activity is inhibited by hydrogen peroxide in concentrations higher than  $10^{-3}$  M but it is activated by less concentrations. Fish AChE in contrast to bovine enzyme is more sensitive to action of hydrogen peroxide. Inhibiting effect of ROS upon AChE is determined by structure functional alterations in tertiary structure of enzyme protein.

## **ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У СИГОВ (*COREGONUS LAVARETUS* L.), ОБИТАЮЩИХ В ХВОСТОХРАНИЛИЩЕ ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА**

**М.В. Чурова, О.В. Мещерякова, Н.Н. Немова**

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН,  
Петрозаводск, Россия  
mchurova@yandex.ru

Оценивали влияние сточных вод на состояние сигов *Coregonus lavaretus* L., обитающих в озере Костомукшское, хвостохранилище Костомукшского горно-обогатительного комбината (ГОК). Вода в озере отличается высокой минерализацией, щелочным значением pH, высоким содержанием ионов калия, сульфатов и нитритов, повышенным содержанием тяжелых металлов (Zn, Ni, Cr, Co, Cd, Cu), наличием мелкодисперсной механической взвеси.

Важной составляющей в оценке состояния, роста и развития рыб при изменении условий окружающей среды является исследование их биохимических параметров. Изменения на клеточном и молекулярном уровне, возникающие в организме рыб, происходят на самых ранних этапах негативного воздействия задолго до того, как проявятся изменения на физиологическом, организменном и популяционном уровне. Исследуя уровень экспрессии генов и активность ключевых ферментов энергетического обмена и метаболизма углеводов у рыб при воздействии различных факторов среды можно оценить интенсивность и направление путей энергетического и пластического обмена и выявить механизмы поддержания необходимого уровня метаболического гомеостаза. В оценке состояния и темпов роста рыб в зависимости от влияния различных условий (питание, стресс, чистота водоема) также используется индекс отношения нуклеиновых кислот между собой РНК/ДНК. Он показывает, как меняется уровень клеточной РНК и, соответственно синтез белка, при постоянной концентрации ДНК в клетке. Показатель РНК/ДНК является достаточно чувствительным к различным видам загрязнения водных экосистем.

Определяли уровень экспрессии генов лактатдегидрогеназы изоформы А<sub>4</sub> (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) и цитохромоксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1) определяли в белых мышцах рыб методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Активность ферментов ЛДГ, ЦО, малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49), альдолазы (КФ 4.1.2.13), α-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8) в белых мышцах и печени определяли спектрофотометрически. Концентрацию РНК и ДНК определяли спектрофотометрически.

Контролем служили сиги, выловленные в чистом озере с аналогичным температурным режимом и глубиной (оз. Каменное). Выборки составили рыбы возраста 3+ и 4+.

Согласно полученным значениям активностей исследуемых ферментов в органах сигов из хвостохранилища наблюдались значительные изменения в метаболизме. Происходило снижение

аэробного синтеза АТФ, о чём свидетельствовало уменьшение по сравнению с контролем активности цитохром с оксидазы на 31% ( $p \leq 0,05$ ) и 39% ( $p \leq 0,05$ ), подавление активности малатдегидрогеназы на 21% ( $p \leq 0,05$ ) и 50% ( $p \leq 0,05$ ) в мышцах и печени, соответственно. Уровень экспрессии гена цитохром с оксидазы в мышцах не изменялся. Такой результат связан, скорее всего, с тем, что мелкодисперсная механическая взвесь накапливается в жабрах и блокирует поступление кислорода в органы, вызывая гипоксическое состояние организма.

Изменения в углеводном обмене мышц и печени различались. В мышцах по сравнению с контролем увеличивались уровень экспрессии гена ЛДГ-А<sub>4</sub> на 27% ( $p \leq 0,05$ ) активность ЛДГ на 30% ( $p \leq 0,05$ ), что указывает на усиление анаэробного синтеза АТФ в ходе гликолиза вследствие снижения аэробных процессов энергообеспечения. Однако снижение активности альдолазы на 20% ( $p \leq 0,05$ ), свидетельствовало о снижении уровня использования углеводов в энергетическом обмене. Активность  $\alpha$ -ГФДГ в мышцах уменьшалась на 23% ( $p \leq 0,05$ ). Уровень активности Г-6-ФДГ в мышцах был ниже на 53% по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ), что указывает на снижение окисления углеводов в пентозофосфатном пути (ПФП). В процессе ПФП образуются восстановительные эквиваленты НАДФН для реакций синтеза липидов, восстановления глутатиона; и пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот. Действительно, наблюдалось снижение концентрации РНК на 25% ( $p \leq 0,05$ ). Значение показателя РНК/ДНК составляло  $0,81 \pm 0,02$ , что было ниже, чем у сигов из контрольного озера  $0,91 \pm 0,03$  ( $p \leq 0,05$ ), что указывает на снижение темпов роста рыб.

В печени сигов, наоборот, значительно усиливался метаболизм углеводов. Активность альдолазы повышалась на 47% ( $p \leq 0,05$ ), активность ЛДГ на 53% ( $p \leq 0,05$ ). В связи со снижением аэробного синтеза АТФ в печени интенсификация метаболизма углеводов была обусловлена усилением их использования в процессах анаэробного энергообеспечения. В условиях гипоксии повышенное значение активности ЛДГ указывает также на усилении глюконеогенеза, что связано с поступлением в печень лактата из других органов. Активность Г-6-ФДГ была выше в 3 раза по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ), что свидетельствует об интенсивном окислении углеводов в ПФП. Возможно, это связано с увеличением потребности в эквивалентах НАДФН для восстановления глутатиона, компонента глутатионредуктазной системы, участвующей в процессах детоксикации ксенобиотиков. Активность  $\alpha$ ГФДГ была выше в 3 раза ( $p \leq 0,05$ ), что вместе с повышенной активностью Г-6-ФДГ указывает на усиление синтеза липидов.

Таким образом, выявленные изменения в уровне экспрессии генов и активности исследуемых ферментов, показателе РНК/ДНК в органах сигов позволяют оценить общее состояние рыб и предположить механизмы биохимической адаптации к неблагоприятному воздействию сточных вод ГОКа. Наблюдаемое снижение роста сигов из хвостохранилища можно объяснить перераспределением энергетических затрат в сторону некоторых метаболических процессов, а именно на компенсаторные реакции анаэробного синтеза АТФ при снижении аэробного, синтез липидов и детоксикацию.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-3731.2010.4; гранта РФФИ 08-04-01140, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России на 2009–2011 гг.», программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие на 2009–2011 гг.»*

## **GENE EXPRESSION AND ACTIVITIES OF ENZYMES OF ENERGY AND CARBOHYDRATE METABOLISM OF WHITEFISH (*COREGONUS LAVARETUS* L.) FROM THE TAILING DUMP OF KOSTOMUKSHA IRON MINING AND ORE DRESSING MILL**

**M.V. Churova, O.V. Mescherjakova, N.N. Nemova**

Institute of biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia  
mchurova@yandex.ru

To assess impacts of metal mining effluent on fish condition, we have studied enzymes of energy and carbohydrate metabolism in whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) from the tailing dump of the Kostomuksha iron mining and ore dressing mill. Expression of genes of lactate dehydrogenase isoform A<sub>4</sub> (LDH) and cytochrome c oxidase (CCO) and RNA/DNA ratio were measured in white muscle. Activities of CCO, LDH, aldolase,

glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (1-GPDH) were studied in muscles and liver. There were significant changes in the RNA/DNA ratio, expression of LDH-A<sub>4</sub> gene and activities of all studied enzymes both in liver and muscles.

## **ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ТЕПЛОПРОДУКЦИЮ ГИДРОБИОНТОВ**

**В.Г. Шайда**

Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, Украина  
svg-41@mail.ru

Изучение действия физических полей на водные экосистемы приобретает все большее значение в связи с интенсивной эксплуатацией прибрежных территорий и морских акваторий. Совершенно очевидно, что различные физические поля, генерируемые установками, расположенными на морском транспорте и объектах береговой инфраструктуры, могут существенным образом повлиять на метаболизм гидробионтов. Оценка этих изменений требует разработки быстрых, хорошо воспроизводимых и адекватных методов тестирования. Проблема приобретает особое значение в настоящее время в связи с интенсивным антропогенным воздействием на гидросферу, что приводит к существенным, порой необратимым изменениям жизнедеятельности обитателей водных систем. В связи с этим своевременная и адекватная оценка их состояния и разработка соответствующих методов для этого приобретает все большую значимость и актуальность. Существующие методы анализа в основном касаются определения содержания химических загрязнителей в биоте и основаны на длительных и дорогостоящих процедурах, требующих наличия специальной технической базы, включающей комплекс дорогостоящих приборов и реагентов, специального оборудования и обученного персонала, что не всегда возможно осуществить централизованно. Для оценки действия физических факторов и их нормирования для водных организмов число таких методов крайне ограничено. В связи с этим все большую популярность приобретают методы биотестирования, то есть исследование ответных реакций различных живых организмов на действие физических факторов в водной среде.

Известно, что пагубный эффект стрессового воздействия в первую очередь нарушает состояние обменных процессов, что предполагает анализировать именно эти отклики как наиболее чувствительные. Однако, изменения биохимических показателей не всегда четко выражены и имеют одинаковую направленность, их вектор во многом зависит от концентрации действующего фактора и физиологического состояния организма. Следует учитывать также, что все биохимические измерения возможны только после гибели животных, что вносит дополнительный стрессовый фактор. В связи с этим особую значимость приобретают такие методы, которые позволяют оценить биологические эффекты стрессоров при жизни организма в течение достаточно короткого времени, не травмируя тест-объект. Для этих целей нами был использован один из достаточно чувствительных методов – микрокалориметрия, позволяющая с высокой точностью измерить общий метаболизм организма и его изменения при действии неблагоприятных факторов прижизненно.

Жизнедеятельность организма связана с переходом одних видов энергии в другие, что сопряжено с выделением и поглощением тепла. Исследование тепловых процессов живых систем позволяет проанализировать такие важнейшие свойства объекта как теплоемкость, теплопроводность, внутренняя энергия, энтальпия, энтропия, а также их изменения под действием различных, в том числе неблагоприятных факторов. Водные организмы очень чувствительны к изменениям среды обитания. Вариации биотических и абиотических факторов вызывают сдвиги обмена веществ, влияют на рост, развитие, поведение, плодовитость и воспроизводство гидробионтов. В связи с этим теплопродукция организма является достаточно чувствительным и интегральным параметром, реагирующим даже на незначительные изменения окружающей среды.

Метод микрокалориметрии позволяет изучать процессы ранних сдвигов обменных реакций гидробионтов в прижизненном состоянии. В изменяющихся условиях среды в процессе адаптивных реакций происходит интенсивное поглощение кислорода, усиление энергетического обмена, смена энергетических субстратов, изменение степени проницаемости клеточных мембран. Все эти реакции оказывают существенное влияние на проявление метаболической активности, которую можно определить с помощью метода микрокалориметрии на Мониторе биологической активности ТАМ