

На правах рукописи



Амелина Виолетта Сергеевна

**КИСЛЫЕ ПУКЛЕАЗЫ И ИХ РОЛЬ
В ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЯХ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Специальность 03.00.04 - биохимия

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук

**Петрозаводск
2006**

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии
Института биологии Карельского научного центра
Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
ВЫСОЦКАЯ Римма Ульяновна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
ШАРОВА Наталья Петровна
доктор биологических наук
ОЛЕЙНИК Виктор Михайлович

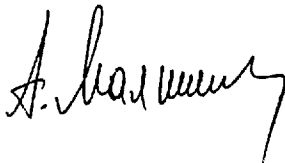
Ведущее учреждение: Московский Государственный
областной университет

Защита состоится " 8 " декабря 2006 года в 12 часов на заседании
Диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском Государствен-
ном педагогическом университете по адресу: 185035 Республика Карелия,
г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского госу-
дарственного педагогического университета.

Автореферат разослан " 7 " ноября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Малкиель А.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из фундаментальных проблем биологии является проблема адаптации. По определению Дж. Харборна (1985), адаптация «представляет собой способность живых организмов приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды с одновременным повышением вероятности выживания и самовоспроизводства». На клеточном и тканевом уровне приспособительные реакции реализуются, главным образом, за счет качественных и количественных преобразований ферментных систем (Хочачка, Сомеро, 1988).

Многочисленная группа ферментов, осуществляющих расщепление нуклеиновых кислот с образованием фрагментов различной длины, объединяется под названием нуклеазы (Шапот, 1968). Нуклеазы с максимальной активностью при кислых значениях pH локализованы, преимущественно, в лизосомах, где наряду с другими кислыми гидролазами осуществляют различные катаболические реакции, лежащие в основе важнейших физиологических и биохимических процессов (Покровский, Тутельян, 1976; Высоцкая, Руокалайнен, 1993). В частности, лизосомальным ферментам принадлежит большая роль в процессах внутриклеточного переваривания биополимеров, аутолизе структур и клеток, утративших свое значение, а также, в процессах оплодотворения, спермато- и оогенеза, метаморфоза, дифференцировки, деления и старения клеток, апоптозе, в защите организма от чужеродных агентов, начальных стадиях иммуногенеза, лизисе тканей при повреждении, детоксикации ксенобиотиков (Покровский, Тутельян, 1976; Немова, Высоцкая, 2004; Кулинский, 1999; Барановский и др., 2004; Griffiths, Isaaz, 1993; Reddy et al., 2001; Evans, Aguilera, 2003; Terman et al., 2006).

Чрезвычайная важность обмена нуклеиновых кислот в жизнедеятельности клетки обуславливает интерес к ферментам их катаболизма. К настоящему моменту детально изучены нуклеазы микроорганизмов (Lyon et al., 2000; Condon, 2003; Person et al., 2003), млекопитающих и человека (Барановский и др., 2004; Ikeda et al., 1997; Brambila et al., 2001; Krieser et al., 2002; Evans, Aguilera, 2003), некоторых насекомых (Бочкова, 1980; Коничев и др., 1982; Kawane et al., 2003; Evans et al., 2002). Работы по изучению нуклеаз рыб и других водных организмов единичны (Высоцкая и др., 1980; Бердышев, Бабенюк, 1985; Попов и др., 2003). Экологическая значимость этих ферментов практически не исследована. Между тем, изучение нуклеолитических ферментов именно у водных обитателей, характерной особенностью которых является более тесная связь со средой обитания, могло бы внести существенный вклад в понимание механизмов адаптации организмов на биохимическом уровне.

Цели и задачи исследования. Цель работы - изучение активности кислых РНКаз и ДНКаз морских и пресноводных организмов, принадлежащих к разным таксонам, выяснение роли нуклеаз в приспособительных реакциях гидробионтов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- определить активность кислых нуклеаз в органах и тканях рыб и беспозвоночных гидробионтов;
- исследовать значимость нуклеаз в ответных реакциях пойкилотерм-

ных животных при воздействии на них естественных и антропогенных факторов среды;

- изучить фракционный состав кислых нуклеаз у разных видов гидробионтов;
- выявить возможность применения исследуемых показателей в эколого-биохимическом мониторинге водоемов.

Научная новизна работы. Получены новые данные по изменению активности и молекулярной гетерогенности состава кислых нуклеаз морских и пресноводных гидробионтов под действием естественных факторов среды (соленость, гипоксия) и различных типов антропогенного загрязнения водоемов (тяжелые металлы, нефтепродукты, компоненты буровых растворов). Впервые показана возможность применения теста активности лизосомальных нуклеаз для оценки химических взаимовлияний животных в сообществах обрастания. Впервые исследована нуклеазная активность лизосом морских беспозвоночных. Охарактеризован спектр изоформ кислой дезоксирибонуклеазы у ранее не изученных в этом отношении объектов.

Практическое значение работы. Полученные данные расширяют представления о роли лизосомальных нуклеаз в биохимических адаптациях водных организмов к естественным, антропогенным и биотическим факторам окружающей среды. Результаты исследований по влиянию различных типов загрязнения воды на исследуемые биохимические показатели указывает на возможность их применения в эколого-биохимическом мониторинге для оценки физиологического состояния гидробионтов при техногенной трансформации водных экосистем.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2004), международной конференции «Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря» (Петрозаводск, 2004), международной конференции молодых исследователей «Физиология и медицина» (Санкт-Петербург, 2005), школке-конференции по биологии развития (Звенигород, 2005), конференции «Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества)» (Петрозаводск, 2005), X научной конференции ББС МГУ (пос. Пояконда, 2006), выездном заседании Бюро ОБН РАН (Петрозаводск, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ, из которых 11 статей и 14 тезисов докладов, в том числе, в центральной реферируемой печати статья и краткое сообщение.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, четырех глав результатов исследования, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертационная работа изложена на 175 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 33 рисунка. Список цитируемой литературы включает 302 названия.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы изложены современные представления о структуре, свойствах и биологической роли ферментов, гидролизующих нуклеи-

новые кислоты, в том числе в адаптациях животных к действию различных экологических факторов.

Глава 2. Материал и методы исследований

Материал. Эксперименты по теме диссертации проводились в 2003 – 2006 гг. в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского НЦ РАН. Материал для отдельных исследований был получен при содействии лаборатории физиологии и токсикологии водных животных Института биологии внутренних вод РАН (пос. Борок), Кандалакшского государственного природного заповедника (Мурманская обл.), Беломорской биологической станции Зоологического института РАН "Картеш" (Карелия, Лоухский район), лаборатории экологической токсикологии СевНИИРХ (г. Петрозаводск), кафедры зоологии и экологии ПетрГУ (г. Петрозаводск).

Объектами исследований служили морские и пресноводные гидробионты, относящиеся к различным таксонам: костистые рыбы, двустворчатые моллюски, ракообразные. В экспериментах использовали 6 видов пресноводных рыб, относящихся к 4 семействам: сем. *Esocidae* (щука *Esox lucius* L.), сем. *Percidae* (окунь *Perca fluviatilis* L., судак *Sitostedion lucioperca* L.), сем. *Coregonidae* (сиг *Coregonus lavaretus* L., ряпушка *Coregonus albula* L.), сем. *Cyprinidae* (лепц *Abramis brama* L.), 2 вида морских рыб сем. *Gadidae* (навага *Eleginus navaga* Pallas, треска *Gadus morhua* L.), беспозвоночных Белого моря: двустворчатых моллюсков сем. *Mytilidae* (мидий *Mytilus edulis* L.) и ракообразных амфипод рода *Gammaridae* spp.

В качестве материала для биохимического анализа использовали различные органы и ткани рыб (белые мышцы, печень, гонады, жабры, селезенка и почки), отдельные органы моллюсков (мантия и нога), а также гомогенаты цельных организмов беспозвоночных мидий и амфипод.

Приготовление гомогенатов тканей. Из тканей готовили 10 %-ные гомогенаты в 0,25 М растворе сахарозы (рН 7,4), содержащем 0,001 М ЭДТА при помощи тефлонового гомогенизатора Поттера-Эльвейема. Для учета мембранносвязанной активности ферментов в суспендирующую среду добавляли неионный детергент Тритон X-100 в конечной концентрации 0,1 % (Покровский, Тутельян, 1976). Полученный гомогенат центрифугировали в течение 30 мин на центрифуге с охлаждением при 12 000 об/мин. Супернатант использовали для анализа.

Определение активности кислых нуклеаз. Активность кислых нуклеаз определяли спектрофотометрически по нарастанию кислоторастворимых продуктов гидролиза. В качестве субстратов для определения активности ферментов использовали 0,1 %-ные растворы соответствующих нуклеиновых кислот на ацетатном буфере, рН 5,0 для ДНКазы и 5,2 для РНКазы. Активность кислой ДНКазы (КФ 3.1.4.6) – по методу А. А. Покровского и А. И. Арчакова (1968), кислой РНКазы (КФ 3.1.4.23) – по методу А. П. Левицкого с соавт. (1973). Активность нуклеаз выражали в условных единицах ΔE_{260} в 1 мин на 1 г сырого веса ткани или на 1 мг белка. Содержание белка в тканях определяли по методу Лоури.

Разделение множественных молекулярных форм кислой ДНКазы. Фракционирование изоформ кислой ДНКазы осуществляли по несколько модифицированной методике энзим-электрофореза (Коничев и др., 1980;

Попов и др., 2003). Электрофорез проводили в вертикальных пластинах полиакриламидного геля в щелочной буферной системе, включая в разделяющий гель высокополимерную ДНК для выявления дезоксирибонуклеазной активности белковых фракций (Boyd, 1970).

Статистическая обработка данных. Результаты исследований обработаны общепринятыми статистическими методами (Кокунии, 1975). Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали с помощью критерия Стьюдента для малых выборок ($n < 30$). Различия между выборками считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Распределение нуклеазной активности лизосом в органах и тканях различных видов рыб

Лизосомы присутствуют во всех клетках животных, за исключением, быть может, зрелых эритроцитов. Однако, количественные и качественные характеристики лизосомальных ферментов в разных органах могут варьировать, в связи с дифференциацией клеток высокоразвитых организмов и приобретением лизосомами, помимо внутриклеточного пищеварения, дополнительных функций, таких как, макрофагия, кринофагия, участие в апоптозе и иммуногенезе, реконструктивная функция и др. (Покровский, Тутельян, 1976; Покровский, Крыстев, 1977; Halton, 1997; Kohler et al., 2002; Griffiths, 2003;).

В данной главе представлены результаты изучения тканевого распределения активности кислых нуклеаз в различных органах и тканях 6 видов пресноводных и 2 видов морских рыб (табл. 1).

Таблица 1. Активность кислой ДНКазы в органах разных видов пресноводных и морских рыб (в $\Delta E260$ на 1 г ткани в 1 мин при 30 °C)

Вид	Пол	Печень	Жабры	Гонады	Мышцы	Почки
судак	♀	1,230 ± 0,062	0,800 ± 0,040	0,760 ± 0,038	0,310 ± 0,016	
лещ	♀	0,920 ± 0,046	0,720 ± 0,036	0,700 ± 0,035	0,240 ± 0,012	1,420 ± 0,71
	♂	0,770 ± 0,039	0,820 ± 0,041	0,340 ± 0,017	0,300 ± 0,015	1,120 ± 0,056
окунь	♀	1,006 ± 0,050	0,613 ± 0,031	0,796 ± 0,040	0,313 ± 0,016	0,683 ± 0,034
	♂	1,090 ± 0,055	0,539 ± 0,027	1,372 ± 0,069	0,296 ± 0,015	0,862 ± 0,043
ряпушка	♀	0,511 ± 0,026	0,471 ± 0,024	0,618 ± 0,031	0,238 ± 0,012	
	♂	0,400 ± 0,020	0,280 ± 0,014	0,413 ± 0,021	0,218 ± 0,011	
сиг	♀	0,879 ± 0,044	0,854 ± 0,043	0,428 ± 0,021	0,283 ± 0,014	
	♂	0,724 ± 0,036	0,460 ± 0,023	1,017 ± 0,051	0,350 ± 0,017	
щука	♀	0,986 ± 0,049	0,465 ± 0,023	0,894 ± 0,045	0,413 ± 0,021	
	♂	0,619 ± 0,031	0,528 ± 0,026	0,516 ± 0,026	0,395 ± 0,020	
треска	♀		0,260 ± 0,013		0,283 ± 0,014	
	♂	0,689 ± 0,034	0,363 ± 0,018		0,266 ± 0,013	
навага	♀	0,789 ± 0,039	0,443 ± 0,022	0,799 ± 0,040	0,340 ± 0,017	
	♂	0,826 ± 0,041	0,436 ± 0,022		0,333 ± 0,017	

Анализ полученных данных показал, что максимальная активность лизосомальных нуклеаз присуща активно метаболизирующим органам, таким как печень и почки. Несколько ниже, но также достаточно высокая нуклеазная активность лизосом отмечена в жабрах рыб. Наименьшей активностью характеризуется мышечная ткань. Установленные закономерности распределения активности кислых РНКазы и ДНКазы в тканях рыб обнаруживают значительное сходство с количественным соотношением лизосом в исследованных тканях, описанным в литературе для разных объектов (Покровский, Тутельян, 1976; Покровский, Крыстев, 1977). Особенно высокий уровень дезоксирибонуклеазной активности в кислой области рН отмечается в гонадах половозрелых самцов, что связано с участием лизосомальных ферментов в процессах сперматогенеза и оплодотворения (Нечаевский, Иванов, 1995; Высоцкая, 1999; Позднякова и др., 2003).

Необходимо отметить, что сравнение биохимических показателей у разных видов рыб затруднено широкой вариабельностью активности ферментов в зависимости от физиологического состояния организма, стадии жизненного цикла, влияния различных факторов среды обитания (Высоцкая и др., 1980; Немова, 1996). В целом, виды, относящиеся к одному семейству, имеют сходную картину распределения нуклеазной активности в различных органах, но величины ферментативной активности различаются. Таким образом, между положением вида рыб на эволюционной лестнице и величиной активности лизосомальных нуклеаз прямой зависимости не обнаружено.

Глава 4. Влияние различных типов антропогенного загрязнения на активность кислых нуклеаз водных организмов

4. 1. Влияние накопления ртути в тканях рыб в сочетании с закислением и гумификацией водоема на активность кислых нуклеаз окуня *Percu fluviatilis* L.

Биогеохимический цикл ртути, поступающей в водоемы при атмосферном переносе и с территории водосборного бассейна, в значительной степени зависит от сопутствующих факторов среды, главным образом, реакции среды и содержания органики в воде (Мур, Рамамурти, 1987; Степанова, Комов, 1996; Немова и др, 2001; Немова, 2005; Hintelmann et al., 1997). Специфической особенностью малых озер Карелии является заболоченность водосборной территории и, как следствие, повышенное содержание гуминовых веществ и водородных ионов, способствующих образованию биодоступных форм ртути (Заличева и др., 2002; Моисеенко, 2002). В таких условиях даже фоновые концентрации ртути в водосемах могут представлять серьезную опасность для гидробионтов (Комов, 2004; Немова, 2005).

Для изучения биохимического ответа рыб на сочетанное действие перечисленных факторов был проведен сравнительный анализ нуклеазной активности у окуней, отловленных в 1999–2002 гг. из ряда водоемов Карелии, близких по ряду гидрохимических характеристик, но существенно различающихся по степени закисленности и гумифицированности (табл. 2). Концентрацию соединений ртути в мышцах рыб определяли сотрудники ИБВВ РАН (пос. Борок) с помощью метода атомной абсорбции (Назаренко и др., 1986).

По результатам проведенных исследований выявлены заметные отличия в активности исследованных ферментов в тканях окуней из темновод-

ных закисленных озер с повышенным содержанием ртути в мышцах по сравнению с обитателями светловодных, менее кислых водоемов с низким содержанием ртути (рис. 1). Как правило, активность лизосомальных нуклеаз в органах рыб из самого кислого и гумусного оз. Вуонтеленъярви была значительно снижена. Изменение активности обоих исследуемых ферментов были однонаправлены, однако, дезоксирибонуклеазная активность снижается в большей степени, чем активность рибонуклеазы.

Таблица 2. Некоторые гидрохимические характеристики исследованных озер и содержание ртути в мышцах обитающих в них окуней *Perca fluviatilis* L.

водосм	S (га)	цветность (Hazen)	pH	концентрация Hg в мышцах рыб (мг/кг сырой массы)
оз. Урос	426	9	5.9	0.12 (0.06 - 0.18)
оз. Чучьярви	112	8	5.0	0.10 (0.08 - 0.13)
оз. Вендюрское	998	23	7.0	0.15 (0.10 - 0.24)
оз. Вегарусъярви	1880	105	5.1	0.34 (0.20 - 0.44)
оз. Вуонтеленъярви	394	186	4.6	0.53 (0.32 - 1.03)

Наибольший интерес в экологических и экотоксикологических исследованиях представляет модуляция метаболизма в органах, участвующих в поглощении (жабры), выведении (почки) и детоксикации (печень) ксенобиотиков. В данном эксперименте в печени окуня наблюдается дозозависимый эффект понижения активности кислой ДНКазы по мере увеличения накопления Hg в тканях рыб обоих полов. Ингибирование дезоксирибонуклеазной активности лизосом наиболее сильно проявляется у самцов окуня. В печени самок отчетливо прослеживается та же тенденция.

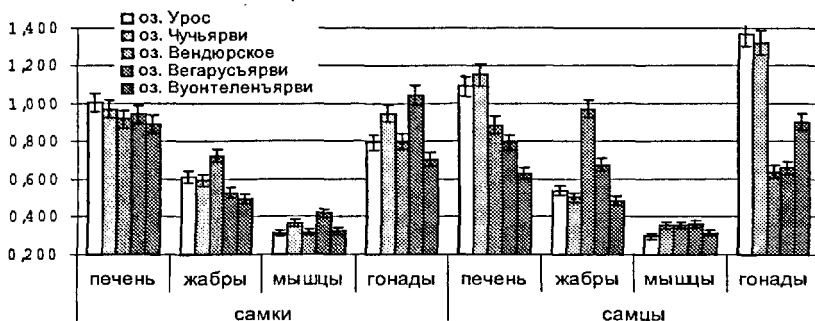


Рис. 1. Активность кислой ДНКазы (ΔE_{260} / г тк / мин) в тканях окуня из озер Карелии.

Точный механизм ингибирования на данный момент не установлен, однако, основываясь на данных литературы можно предположить, что имеет место конкурентное вытеснение тяжелыми металлами ионов металлов-активаторов

из центров связывания, либо восстановление сульфидных групп, приводящее к разрыву дисульфидных связей, нарушению конформации фермента и потере активности (Керова и др., 1974; Эйхенбергер, 1993; Ball, Benedik, 1992). Помимо этого, токсиканты могут влиять на активность ферментов опосредовано, через субстрат, меняя его свойства и, как следствие, доступность для фермента (Трахтенберг и др., 1994; Благой, 1998; Дмитриева, 2002).

В отличие от печени, основным фактором, влияющим на активность лизосомальных нуклеаз в жабрах, является pH воды в озере, из которого выловлена рыба. Наибольшая активность кислой ДНКазы в данном органе отмечена у рыб, обитающих в водоеме с нейтральной реакцией воды (оз. Вендорское). Превалирующее повреждающее действие кислой среды для жабр рыб при сочетании действия низкого pH и загрязнения воды тяжелыми металлами отмечают многие исследователи (Лукьяненко, 1987; Моисеенко, Шарова, 2006; Mazeaud, Mazeaud, 1981; McDonald, 1983; Rosseland, Staurnes, 1994). Однако повышенная кислотность среды сама по себе редко является фактором, снижающим численность рыб (Rosseland, Staurnes, 1994). На организменном уровне основной токсический эффект связан с присутствующими в воде поллютангами, а действие высокой концентрации H^+ в среде в формировании токсикозов у рыб сводится к снижению барьерной функции жабр, вследствие нарушения контроля мембранной проницаемости клеток жаберного эпителия (McDonald, 1983; Rosseland, Staurnes, 1994).

У костистых рыб большая часть двухвалентных металлов, в том числе Hg^{2+} , выводится через почки (Аминова, Яржомбек, 1984). Вовлечение лизосом в процесс экскреции приводит к повышенной концентрации соединений ртути в указанных органеллах и ингибированию активности лизосомальных ферментов (Чекунова, Фролова, 1986; Немова, 2005).

Активность лизосомальных нуклеаз в гонадах окуней обоих полов из светловодных озер Урос и Чучьярви достаточно высока. У самок и в наиболее закисленных гумифицированных водоемах Вегарусьярви и Вуонтеленьярви не отмечается снижения исследуемых биохимических показателей, в отличие от самцов, у которых нуклеазная активность снижается в два раза. Гонады у рыб ежегодно обновляются, вследствие чего накопление ксенобиотиков в данном органе должно быть минимальным, и, соответственно, их влияние на метаболические функции незначительно. Вопреки этому, в семенниках рыб отмечается высокий уровень аккумуляции ртути (Трахтенберг, Иванова, 1984), что и приводит к выраженному ингибированию активности лизосомальных нуклеаз у самцов.

В 2005 году совместно с сотрудниками ИБВВ РАН (пос. Борк) были проведены аналогичные исследования в ряде озер Карелии (Лоухский р-он). Объектом также являлся окунь *Perca fluviatilis*. Водосбор исследуемых озер находится на заболоченной территории, что обуславливает особенности их гидрохимии: высокую цветность воды и несколько пониженные значения pH (5,9 – 7,4). Озера Среднее, Круглое и Кривое относятся к типичным малым бессточным озерам. Озеро Жемчужное превосходит остальные водоемы по размерам, является проточным и располагается западнее остальных, ближе к населенным пунктам, в связи с этим, в мышцах окуней, выловленных в данном водоеме, наблюдается повышенный уровень соединений

ртути – 0,37 мг/кг сырой массы ткани. В мышцах окуней из остальных озер содержание ртути составляет 0,14 мг/кг ткани.

В данном случае изменение биохимических показателей окуней, различающихся аккумуляцией ртути, был несколько иным. В печени и гонадах рыб обоих полов окуней озера Жемчужное, с максимальным содержанием ртути в тканях, отмечается повышенная активность кислых нуклеаз. Активность ДНКазы в жабрах рыб из этого водоема незначительно снижалась.

Повышение активности кислых нуклеаз у окуней, выловленных из оз. Жемчужное, имеет адаптивное значение. Как известно, лизосомы принимают участие в детоксикации и экскреции низких доз катионов тяжелых металлов (Чекунова, Фролова, 1986), в связи с этим, индукция активности кислых гидролаз отражает повышенную потребность организма в защитных функциях лизосом в условиях метаболического стресса, вызванного ртутной интоксикацией. Роль лизосом в данном случае, по всей видимости, состоит не только в выведении ксенобиотика из клетки, но и в освобождении клетки от поврежденных макромолекул, в том числе нуклеиновых кислот с нарушенной структурой.

При сравнительном анализе результатов двух натуральных исследований становится очевидным, что окунь из водоемов Северной Карелии, характеризующихся реакцией среды близкой к нейтральной, отличается более высокой устойчивостью к ртутной интоксикации организма по сравнению с обитателями более закисленных озер. Таким образом, интегральное воздействие накопления ртути у рыб при сопутствующей значительной ацидификации ($\text{pH} < 5,5$) и гумификации водоема приводит не только к ингибированию лизосомальных нуклеаз в тканях окуня *Perca fluviatilis* и биохимических реакций, катализируемых этими ферментами, но и подавляет протекторные функции лизосом в целом, снижая, тем самым, адаптивные способности рыб, возможность выживания и размножения вида при действии описанного комплекса факторов.

В целом, самцы оказались более чувствительны к неблагоприятным факторам среды, чем самки. Об этом свидетельствует более высокая степень ингибирования активности лизосомальных нуклеаз в органах самцов окуня. Следует также отметить, что при анализе отловленного материала из различных по кислотности озер было обнаружено, что в оз. Вуонтеленьярви преобладают самки, что лишний раз подтверждает вывод о более высокой токсикорезистентности самок.

4. 2. Изменение активности лизосомальных нуклеаз пресноводных рыб при загрязнении водоема отходами предприятий горно-обогатительной и металлургической промышленности Кольского полуострова

Влияние горно-обогатительного производства на водные экосистемы изучали на двух представителях сиговых рыб: ряпушка *Coregonus albula* L. и сиг *Coregonus lavaretus* L., выловленных в летний период 2003 г. из озера Ковдор. Данный водоем испытывает сильную антропогенную нагрузку, и в наших исследованиях рыбы из этого озера приняты за опытную группу. Условным контролем служили экземпляры сиговых рыб из водоемов, не испытывающих значительного загрязнения: водохранилище Нижняя Пиренга (сиг) и оз. Сямозеро (ряпушка).

Озеро Ковдор испытывает мощное загрязнение сточными водами Ковдорского ГОКа, занимающегося добычей и обогащением комплексных железных и апатит-баделитовых руд, а также коммунально-бытовыми стоками г. Ковдор. Гидрохимический состав воды характеризуется высоким содержанием стронция, железа, алюминия, марганца и кадмия (в порядке убывания), так же отмечается повышенная концентрация анионов: сульфатов, фосфатов и, в особенности, нитратов. Качество поверхностных вод водохранилища Нижняя Пиренга признано удовлетворительным (уровень микроэлементов не превышает ПДК для рыбохозяйственных водоемов). Реакция воды исследуемых водоемов близка к нейтральной (в водохранилище рН воды составляет 6,66–7,23, в озере Ковдор – 7,98).

Сопоставление данных по изменению нуклеазной активности в тканях ряпушки *S. albula* и сига *S. lavaretus* показало, что биохимическая реакция изученных видов на загрязнение водоема промышленными стоками неодинакова.

В органах ряпушки из загрязненного водоема активность кислой ДНКазы была повышена во всех тканях, за исключением гонад (рис. 2). Максимальные отличия значений ДНКазной активности зафиксированы в печени самок ряпушки. Нуклеолитическая активность лизосом у сига из загрязненного озера Ковдор, напротив, была снижена по сравнению с контролем (рис. 3).

Повышение исследуемых показателей у ковдорской ряпушки по сравнению с контрольным уровнем ферментативной активности свидетельствует о значительных перестройках метаболизма, имеющих, по всей видимости, приспособительное значение. Наиболее показательна в этом плане резкая активация лизосомальных нуклеаз в печени рыб из загрязненного водоема, указывающая на мобилизацию защитных функций данного органа. Детоксикационные системы печени *S. albula* при данном уровне антропогенной нагрузки, очевидно, оказываются достаточно эффективными для предотвращения значительного негативного воздействия ксенобиотиков в других органах и тканях рыб, о чем можно судить по отсутствию характерного ингибирования дезоксирибонуклеазной активности в условиях интоксикации организма тяжелыми металлами. Следует заметить, что иногда трудно провести грань между приспособительной активацией и патологическими изменениями, для которых так же характерна высокая активность ферментов катаболизма, в частности, лизосомальных гидролаз (Высоцкая и др., 1991). Однако привлечение результатов морфо-анатомического анализа показало, что доля рыб, имеющих

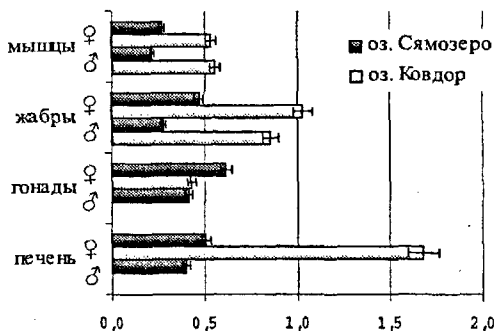


Рис. 2. Активность лизосомальной ДНКазы (в ДЕ260/г тк/мин) в тканях ряпушки *Coregonus albula* из разных озер.

выраженные нарушения внутренних органов, была незначительна. Более того, ряпушка, обитающая в озере Ковдор, характеризуется предельно крупными размерами и активным размножением. На основании вышесказанного предположения адаптивного характера биохимических изменений, наблюдаемых в тканях рыб указанного вида из загрязненного озера, кажется вполне обоснованным.

У сига *Coregonus lavaretus*, обитающих в условиях загрязнения воды стоками ГОКа, в отличие от ряпушки, понижена активность кислых ДНКазы и РНКазы практически во всех исследуемых органах по сравнению с показателями рыб из контрольного водоема. Первоначальное предположение о снижении уровня метаболических процессов у сига из озера Ковдор было отвергнуто на основании результатов исследования других

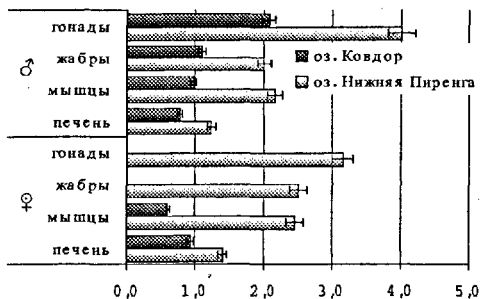


Рис. 3. Активность кислой ДНКазы (в ΔE260/г тк/мин) в тканях сига *Coregonus lavaretus* из разных водоемов.

лизосомальных и цитоплазматических ферментов, активность которых оказалась выше, чем в контрольной группе рыб (Высоцкая и др., 2005). И только в случае нуклеаз наблюдалось снижение общей активности ферментов под действием данного типа загрязнения. Причиной данного явления, вероятно, служит более высокий уровень накопления в тканях сига опытной группы, по сравнению с ряпушкой, эссенциальных микроэлементов. В первую очередь это относится к Cu^{2+} , Zn^{2+} и Mn^{2+} , способных в зависимости от концентрации выступать в роли, как активаторов, так и ингибиторов кислых нуклеаз (Керова и др., 1974; Бердышев, Бабенюк, 1985). Это предположение было подтверждено результатами эксперимента *in vitro* по действию различных доз сульфата цинка на рибонуклеазную активность изолированных лизосом.

Различие биохимической реакции рыб разной видовой принадлежности наблюдали также при исследовании влияния отходов медно-никелевого производства на активность ферментов сига *Coregonus lavaretus* L., щуки *Esox lucius* L. и окуня *Perca fluviatilis* L., выловленных в июле 2004 г. из двух озер Мурманской обл., различающихся по степени антропогенной нагрузки – оз. Раякоски и оз. Куетсиярви. Оба водоема относятся к озерно-речной системе р. Пасвик. Источниками загрязнения в оз. Куетсиярви (опытный объект) являются сточные воды одного из крупнейших в Европе медно-никелевого комбината "Печенганикель", аэротехногенные выбросы предприятия, содержащие тяжелые металлы и их аэрозоли, а также бытовые стоки пос. Никель. Воды озера характеризуются высоким содержанием тяжелых металлов, преобладают ионы Ni, Fe, Mn и Al, в меньшей степени, Cu и Zn. Оз. Раякоски находится на территории заповедника и в настоящее время не подвержено значительному загрязнению, поэтому образцы из этого озера использовали в качестве контрольных.

Анализ активности лизосомальных нуклеаз у рыб из указанных водоемов показал, что в наименьшей степени воздействию техногенных вод подвержен окунь *Perca fluviatilis*. В тканях окуня отмечены минимальные различия исследуемых показателей, максимальные - у сига. Наиболее интересным результатом является различие реакции нуклеаз на загрязнение у самок сига и щуки: у самок сига повышение РНКазной и ДНКазной активности в печени сопровождается угнетением активности указанных ферментов в жабрах, у щуки наблюдается прямо противоположная картина.

Среди исследованных объектов по изменению нуклеазной активности лизосом выделяется сиг *Coregonus lavaretus*, динамика показателей окуня и щуки обнаруживает значительное сходство. Причиной этому служат различия в биологии рыб, главным образом, характера питания и места обитания в водоеме, что, в свою очередь, определяет различие путей поступления и уровень интоксикации тяжелыми металлами. У видов, обитающих в верхних горизонтах вод (щука и окунь), поглощение металлов происходит, в основном, через жабры. У глубинных видов, питающихся бентосом (сиг), существует дополнительный источник поступления ксенобиотиков – донные седименты с абсорбированными в них тяжелыми металлами. Отмеченные особенности в характере изменений нуклеазной активности в тканях сига и щуки позволяют предположить, что у данных видов основные защитные функции связаны с разными органами. Стратегия адаптации щуки *Esox lucius* к загрязнению вод отходами металлургического производства заключается, очевидно, в препятствовании проникновению металлов в организм за счет повышения барьерной функции жабр. Активация лизосомального аппарата в данном органе направлена, с одной стороны, на поддержание структуры клеток жаберного эпителия, испытывающих значительную токсическую нагрузку, с другой, на усиление выведения поглощенных токсиантов в окружающую среду.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о крайне неблагоприятном влиянии промышленного комплекса Кольского полуострова на жизнедеятельность гидробионтов и состояние водных экосистем в целом. Обитающие в загрязненных водоемах рыбы до определенной степени способны адаптироваться к ухудшению качества воды, однако, устойчивость водных организмов зависит от ряда факторов. Одними из основных факторов, влияющих на токсикорезистентность низших позвоночных, являются особенности биологии вида, а также половая принадлежность рыб. В целом, самцы оказались более уязвимы к данному типу антропогенного загрязнения, чем самки. Наиболее очевидным свидетельством в пользу этого утверждения является сохранение нормального уровня активности исследуемых показателей в гонадах самок, чего нельзя сказать о самцах.

4. 3. Влияние антропогенного загрязнения морских побережий на активность кислых нуклеаз беспозвоночных гидробионтов

Проблема загрязнения прибрежной акватории Белого моря вследствие хозяйственной деятельности человека в настоящее время стоит чрезвычайно остро. Наиболее неблагоприятная экологическая ситуация наблюдается в Кандалакшском заливе. Спектр поллютантов, попадающих в залив, достаточно широк. В первую очередь, это бытовые стоки населенных

пунктов, нефтяное загрязнение, органические вещества, образующиеся при разложении отходов деревообрабатывающей промышленности, ионы различных металлов, в том числе, тяжелых (Наумов, Оленев, 1981). Удобными и часто используемыми объектами экологических исследований являются беспозвоночные прибрежной зоны благодаря их повсеместному распространению, привязанности к месту обитания и ключевой роли в трофических цепях морских биоценозов (Регеранд, Дубровина, 1995; Riba, Del Vals et al., 2004; Nagelkerken, Debrot, 1995).

В данном разделе представлены результаты исследования влияния комплексного загрязнения на нуклеазную активность лизосом в тканях типичных представителей макрозообентоса Беломорского побережья: двусторчатых моллюсков *Mytilus edulis* L. и ракообразных амфипод *Gammaridae*. Животных собирали в различных зонах прибрежной акватории Кандалакшского залива в летний период 2003 года. Точки сбора проб различались по удаленности от населенных пунктов и типу загрязнения (табл. 3). Контролем служили особи из условно «чистых» зон Белого моря, наиболее удаленных от источников антропогенного воздействия - мыс Турий (точка 1) и губа Порья (точка 2).

Таблица 3. Характеристика точек сбора амфипод *Gammaridae* spp. и мидий *M. edulis* в Кандалакшском заливе Белого моря.

№	Точки сбора	Близость к источникам загрязнения	Преобладающий тип загрязнения
1	мыс Турий	150 км от г. Кандалакша и 30 км от пос. Умба	наиболее чистый район
2	губа Порья	90 км от г. Кандалакша и 30 км от пос. Умба	чистый район
3	о. Ряжков	5 км от пос. Умба	бытовые сточные воды, агрохимия
4	пос. Лувеньга	побережье пос. Лувеньга	
5	о. Большой Берзовый	5 км от г. Кандалакша	бытовые сточные воды, повышенное содержание соединений Са и Р из апатитового концентрата из морского порта г.Кандалакша
6	о. Еловый	5 км от г. Кандалакша	
7	о. Большой Лупчостров	1 км от г. Кандалакша	
8	о. Большая Половинница	2 км от г. Кандалакша	радиоактивное точечное загрязнение Sr ⁹⁰ и Y ⁹⁰ (апрель 2001 г.)
9	о. Малый	1,4 км от г. Кандалакша	нефтепродукты
10	о. Олений	2,5 км от нефтебазы станции Белое море	
11	"механический завод"	в городской черте г. Кандалакша	исорганические кислоты от аккумуляторов, нефтепродукты, бытовые стоки, отходы деревообработки

Активность изучаемых ферментов у исследуемых гидробионтов варьирует по-разному (рис. 4). У мидий под воздействием различных загрязнителей нуклеазная активность в той или иной мере снижается,

тогда как у амфипод наблюдается превышение активности РНКазы по мере увеличения техногенной нагрузки. Для этих проб отмечена также несколько повышенная активность кислой ДНКазы.

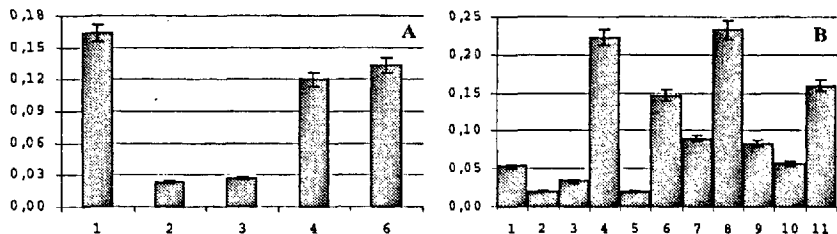


Рис. 4. Активность лизосомальной РНКазы (в $\Delta E260/g$ тк/мин) в гомогенатах мидий *Mytilus edulis* (А) и амфипод *Gammaridae* spp. (В) из различных зон побережья Кандалакшского залива Белого моря.

В данном исследовании в качестве контроля служил материал, собранный в двух чистых зонах Кандалакшского залива – удаленный от источников техногенного загрязнения Турий мыс и побережье Порьей губы, прилегающего к территории Кандалакшского заповедника. Различия ферментативной активности у особей из названных зон, а именно, значительно более низкий уровень активности лизосомальных нуклеаз у беспозвоночных из Порьей губы, оказалось неожиданным и интересным результатом. Причем, для обоих видов снижение активности ферментов было пропорциональным – порядка 65 – 70 % для РНКазы и 35 – 40 % для ДНКазы. Однонаправленность и строгое количественное соотношение изменения активности при схожих условиях среды обитания, не испытывающей посторонних воздействий, позволяет предположить, что зафиксированная разность величин ферментативной активности отражает нормальный диапазон варьирования экзаменуемых параметров. Исходя из сказанного выше, отклонением от нормы считали данные, выходящие за границы означенного интервала.

Анализируя полученные результаты в таком ключе, можно отметить более высокую стабильность показателей нуклеаз моллюсков даже в весьма неблагоприятных зонах, что, по-видимому, имеет большое значение в приспособительных реакциях организмов с относительно низким уровнем развития регуляторных систем, коими являются мидии (Хлебович, 1981). Это позволяет сохранять каталитическую активность при изменении метаболического фонда клетки. Такое предположение хорошо согласуется с результатами исследования свойств других лизосомальных и цитоплазматических ферментов *M. edulis*, для которых также была показана низкая чувствительность к влиянию широкого спектра абиотических факторов (Горомосова, Шапиро, 1984; Высоцкая и др., 2005).

В то же время, повышение рибонуклеазной активности ракообразных амфипод *Gammaridae*, свидетельствующее об интенсификации синтетических процессов, и модуляция активности ряда протеолитических фермен-

тов лизосом под влиянием антропогенной нагрузки (Бондарева, 2004), указывают на существенные метаболические сдвиги в клетках амфипод из загрязненных зон. Описанные биохимические перестройки, а также изменения качественного состава белков, отмеченные у другого представителя рода *Gammarus*, обитающего в зоне городского стока (Руднева, 2000), позволяют заключить, что адаптивные реакции данной группы беспозвоночных к токсическим воздействиям отличаются более высокой специфичностью по сравнению с двусторчатými моллюсками.

4. 4. Изменение нуклеазной активности лизосом двусторчатых моллюсков *Mytilus edulis* L. под действием нефтепродуктов и буровых растворов в аквариальных экспериментах

Исследовали влияние нефтяного загрязнения воды на активность лизосомальных нуклеаз в тканях мидий *Mytilus edulis* L. Для этого предварительно акклиматизированных к лабораторным условиям моллюсков в экспериментальных условиях подвергали воздействию различных концентраций нефтепродуктов. В качестве нефтепродуктов использовалось дизельное топливо, разведенное в морской воде в соотношении 1:9. В каждый из 3-х аквариумов добавляли 15, 50 и 150 мл полученной смеси. В четвертый аквариум раствор дизтоплива не вносили. Истинным контролем, учитывая высокую поглощающую способность морской воды, служили моллюски, содержащиеся в аналогичных условиях в отдельной изотермической комнате.

Результаты исследований показали, что изменение активности кислых нуклеаз у мидий носит дозозависимый характер (рис. 5).

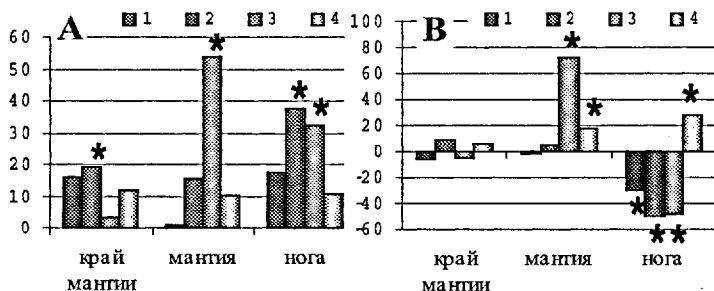


Рис. 5. Изменение удельной активности лизосомальных РНКазы (А) и ДНКазы (В) в тканях мидий *Mytilus edulis* L. под действием раствора дизтоплива (концентрация добавленных нефтепродуктов в мл/л: 1 – 1,0; 2 – 0,3; 3 – 0,1; 4 – 0) (* – отличие от контроля достоверны при $p \leq 0,05$).

Двусторчатые моллюски рода *Mytilus* характеризуются высокой устойчивостью к нефтяному загрязнению, основанной на способности в той или иной степени метаболизировать компоненты нефти различной природы, а также выводить продукты их биотрансформации (Проблемы химического загрязнения..., 1985; Stegeman, Teal, 1973). Активация ферментов лизосом в тканях мидий, наблюдаемая в данном эксперименте, свидетельствует об адаптивной модуляции обмена веществ моллюсков, направленной, очевид-

но, на повышение эффективности утилизации и детоксикации нефтепродуктов. В частности, значение повышения нуклеазной активности, вероятно, заключается в перераспределении ресурсов клетки для обеспечения процессов транскрипции и трансляции ферментов и других макромолекул, участвующих в метаболизме чужеродных органических веществ. Так, в ряде исследований отмечено значительное увеличение содержания нуклеиновых кислот в клетках моллюсков при экспонировании с сырой нефтью (Дивавин, Ерохин, 1978; Дивавин, 1979; Pisoni et al., 2004). Причем низкие концентрации нефти в большей степени стимулируют синтез РНК, нежели ДНК (Проблемы химического загрязнения..., 1985; Дивавин, 1979).

Аквариальный эксперимент по оценке влияния компонентов буровых растворов на моллюсков был поставлен в лаборатории экологической токсикологии СевНИИРХ. Мидий *Mytilus edulis* L. подвергали воздействию различных концентраций исследуемых веществ в течение 30 дней, после чего в гомогенатах цельных мидий определяли активность кислых нуклеаз. Согласно полученным данным, активность РНКазы меняется более значительно, чем ДНКазы, и эти изменения в большей степени носили дозозависимый характер. В частности, дозозависимая активация рибонуклеазной активности отмечается для ПАВ и смазочных материалов. Для лизосомальной ДНКазы, в основном, наблюдается небольшое снижение активности фермента.

Дозозависимый эффект действия нефтепродуктов и буровых растворов на исследуемые биохимические показатели, может быть обусловлен хорошо изученной неспецифической реакцией лизосомального аппарата на метаболический стресс, заключающейся в дифференциальном изменении стабильности мембран лизосом в зависимости от химической структуры, дозы и продолжительности воздействия ксенобиотиков (Mooge, 1979; Viarengo et al, 1981; Moore, 1985; Pellerin-Massicotte et al., 1989; Regoli, 1992; Marigomes, Baybay-Villacorta, 2003).

Глава 5. Влияние естественных (абиотических и биотических) факторов на нуклеазную активность лизосом морских гидробионтов

5. 1. Изменение активности кислых нуклеаз беломорских мидий *Mytilus edulis* L. в условиях экспериментальной аноксии

Как известно, водные обитатели удовлетворяют энергетические потребности организма, поглощая растворенный в воде кислород (Озернюк, 1992). Изъятие гидробионтов из водной среды, как правило, приводит к развитию гипоксии и быстрой гибели организма. Исключение составляют животные приливно-отливной зоны, обладающие способностью к длительному существованию в бескислородных условиях (Горомосова, Шапиро, 1984; Хочачка, Сомеро, 1988). В связи с этим, исследования механизмов адаптации литоральных моллюсков к анаэробнозу и роль лизосомальных ферментов в этих процессах представляет большой интерес.

Изучали изменение удельной активности кислых ДНКазы и РНКазы (ΔE_{260} / мг белка) в гомогенатах цельных мидий *Mytilus edulis* после 24-часового содержания без воды. В эксперименте, поставленном на Беломорской биостанции «Картеш» ЗИН РАН в 2003 г., сравнивали реакцию двух экологических групп моллюсков – литоральных, подверженных периодическому обсыханию, и сублиторальных (плотовых мидий), постоянно находящихся в воде.

Полученные данные показали, что у моллюсков, находившихся без воды в течение суток, наблюдается повышение активности кислых нуклеаз (рис. 6), указывающее на усиление катаболических реакций в клетках моллюсков в условиях аноксии. Активация лизосомального аппарата в данном случае обусловлена переключением метаболизма животных на эндогенные источники энергетических и пластических веществ, т. к. извлечение моллюсков из водной среды означает не только прекращение поступления кислорода, но и дефицит пищи. В таких условиях продукты полного гидролиза нуклеиновых кислот, осуществляемого нуклеазами совместно с другими фофодиэстеразами лизосом, могут быть использованы в клетке для новых синтезов, адекватных потребностям организма.

Результаты исследования позволяют заключить, что на биохимическом уровне реакция моллюсков *Mytilus edulis*, принадлежащих к разным экологическим группам, неодинакова. Согласованное по величине и направленности повышение рибо- и дезоксирибонуклеазной активности у литоральных моллюсков свидетельствует о более высокой эффективности адаптивных механизмов, по сравнению с обитателями сублиторали. Повышенная реактивность ферментативных систем лизосом мидий приливно-отливной зоны позволяет скорректировать метаболизм в более короткий срок, что немаловажно для успешного выживания организма при резких и частых изменениях условий существования.

5. 2. Лизосомальные нуклеазы в приспособительных реакциях морских моллюсков к различной солёности воды

Мидии *Mytilus edulis* L., являясь типичными пойкилосмотическими организмами, не способны регулировать осмотическую концентрацию полостной жидкости (Бергер, 1986). При этом мидии проявляют высокую эвригалинность, заселяя биотопы с широким диапазоном колебания солёности внешней среды, а также сохраняя жизнеспособность при крайних значениях данного фактора (5 ‰ – 75 ‰) в экспериментальных условиях (Хлебович, 1981). Адаптивные реакции, лежащие в основе эврибионтности морских моллюсков, реализующиеся на уровне поведенческих и физиологических реакций, достаточно широко изучены (Луканин, 1971; Наточин, Бергер, 1979; Бергер, Луканин, 1985; Klerowsky, 1963), клеточные и молекулярные механизмы освещены в меньшей степени (Харазова, Бергер, 1974; Meats et al., 1978; Ahokas, Duerf, 1975; Deane et al., 2002). В ряде работ, выполненных на низших позвоночных (осморегуляторы), имеются указания на структурные и функциональные изменения лизосом при опреснении и повышении солёности среды (Moore et al., 1979; Wayne et al., 1981; Petroyi et al., 2004). Для беспозвоночных такие данные в литературе фрагментарны.

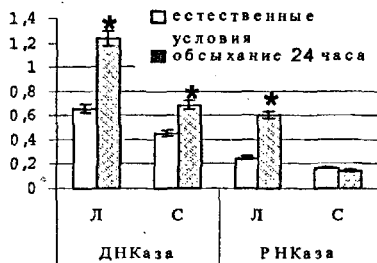


Рис. 6. Удельная активность кислых нуклеаз ($\Delta E_{260}/\text{мг}$ белка) литоральных (Л) и сублиторальных (С) мидий в условиях суточного содержания без воды. (*-отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$)

Для исследования участия лизосомальных РНКазы и ДНКазы в соленостных адаптациях морских моллюсков на базе ББС «Картеш» был поставлен эксперимент, в ходе которого литоральных и сублиторальных мидий, предварительно акклиматизированных к лабораторным условиям, в течение 12 дней выдерживали в аквариумах с водой различной солености: 5 ‰, 15 ‰, 25 ‰, 35 ‰ и 45 ‰ при постоянной температуре 10 °С. Контролем служили моллюски из аквариума с соленостью 25 ‰, соответствующей нормальному уровню солености поверхностных вод данного района Белого моря. Активность ферментов определяли в тканях ноги, краевой и центральной части мантии.

Анализ результатов эксперимента показал, что сублиторальные мидии более чувствительны к изменению соленостного режима. У данной группы моллюсков наблюдается угнетение нуклеазной активности во всех исследованных органах (рис. 7).

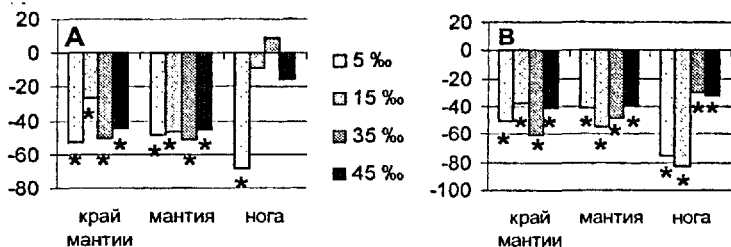


Рис. 7. Активность лизосомальной ДНКазы (А) и РНКазы (В) в тканях сублиторальных мидий при различной солености ($\Delta E_{260}/\text{мг белка}$) (*-отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$)

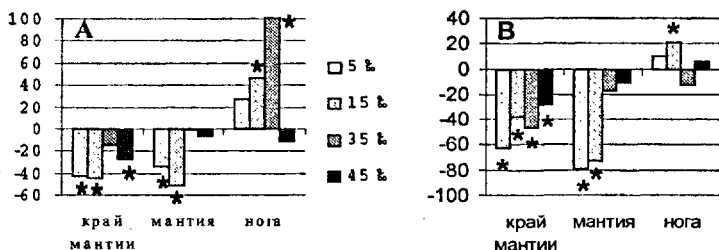


Рис. 8. Активность лизосомальной ДНКазы (А) и РНКазы (В) в тканях литоральных мидий при различной солености ($\Delta E_{260}/\text{мг белка}$) (*-отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$).

Активность исследуемых ферментов в мантии у литоральных мидий снижена при опреснении, однако, в тканях ноги активность кислых нуклеаз не отличается от контроля даже при критической солености 5 ‰ (рис. 8). В условиях повышенной солености достоверные отличия исследуемых

биохимических показателей от контрольного уровня отмечены только в краевой части мантии, наиболее подверженной воздействию окружающей среды, а также в ткани юкты.

Более значительные отклонения активности исследуемых ферментов у мидий, содержащихся в гипотонической среде, позволяет констатировать, что опреснение в большей степени угрожает стабильности обменных процессов в организме моллюсков, чем повышенная концентрация солей в среде. Помещение моллюсков в разбавленную морскую воду приводит к повышенной гидратации клеток и дисбалансу содержания ионов K^+ и Na^+ в клетке, участвующих в поддержании осмотической концентрации внутренней среды (Бергер, Луканин, 1985; Natchin et al., 1979). Накопление в цитозоле ионов калия, являющееся одним из механизмов создания гиперосмотичности клеток моллюсков, оказывает дестабилизирующее воздействие на лизосомальные мембраны, нарушая их проницаемость (Покровский, Тутельян, 1976). Изменение стабильности лизосомальных мембран и, как следствие, увеличение в размерах (набухание) органелл является одним из первых показателей метаболического стресса (Moore, 1979; Moore, 1985; Domouhtsidou, Dimitriadis, 2001; Marigomes, Baybay-Villacorta, 2003; Terman et al., 2006). Несомненно, что изменение состояния мембран, альтерации состава матрикса лизосом оказывают значительное влияние на проявление каталитической активности лизосомальных ферментов (Moore et al., 1987; Marigomes et al., 1989). В частности, одной из причин снижения активности лизосомальных ферментов может быть изменение pH в лизосомах (Покровский, Тутельян, 1976).

Сопоставление реакции литоральных и сублиторальных моллюсков подтвердило сделанный ранее вывод о более высоких адаптивных возможностях мидий приливно-отливной зоны. Так, по результатам эксперимента литоральные моллюски *M. edulis*, успешно акклимируются к различным уровням солености, демонстрируя полную (в случае повышения солености среды) или частичную (при опреснении) нормализацию исследуемых биохимических показателей.

5. 3. Влияние биотических взаимодействий на биохимические показатели мидий *Mytilus edulis* L.

На жизнедеятельность прикрепленных морских организмов, помимо абиотических факторов среды, огромное влияние оказывают внутри- и межвидовые конкурентные отношения. Причем лимитирующим фактором развития в данном случае является не пища, а место на субстрате. У видов, образующих сообщества обрастания, в ходе эволюции сложился определенный арсенал механизмов борьбы за «жизненное пространство». Эти методы борьбы реализуются на самых различных уровнях: от физического обрастания конкурента и различных поведенческих реакций до аллелопатии - химического воздействия, приводящего к подавлению роста или даже гибели особей другого вида. Совокупность этих процессов определяет не только благополучие отдельного вида, но и закономерности формирования сообщества. В связи с этим, понимание характера взаимодействия видов между собой и выявление тонких механизмов таких взаимовлияний в целом и аллелопатии в частности представляет большой интерес.

Настоящая работа являлась частью комплексного исследования, целью

которого была разработана методика, позволяющей оценить взаимные химические влияния в сообществах по изменению биохимического статуса животных. Объектом служили мидии *Mytilus edulis* L., собранные с обработкой искусственных субстратов около БС «Картеш» ЗИН РАН. Моллюсков акклиматизировали к лабораторным условиям. Затем добавляли воду, в которой предварительно в течение 2 суток содержали представителей одного из 5 видов, являющихся основными компонентами сообщества обрастания Белого моря: *Mytilus edulis* L., *Hiatella arctica* L., *Styela rustica* L., *Asterias rubens* L. и *Halichondria panicea* Pallas. Экспозиция составляла 24 часа. Контролем служили моллюски, содержащиеся в природной морской воде. Удельную активность нуклеаз, а также ряда других лизосомальных и цитозольных ферментов, определяли в гомогенатах дистального и проксимального отделов мантии моллюсков.

В дистальном отделе мантии активность кислой ДНКазы достоверно повышалась во всех опытных группах за исключением моллюсков, содержащихся в воде, кондиционированной особями своего вида (рис. 9). Достоверных изменений активности РНКазы в данной ткани не отмечено, в проксимальном отделе достоверно активность РНКазы повышается под действием воды, в которой содержались морские звезды.

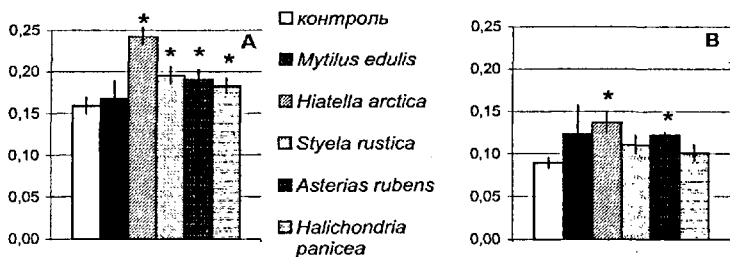


Рис. 9. Активность кислой ДНКазы ($\Delta E_{260}/\text{мг белка}$) в дистальном (А) и проксимальном (В) отделах мантии мидий *M. edulis* L. под действием воды, кондиционированной различными видами животных (* - отличия от контроля достоверны при $p \leq 0,05$).

Реакцию в краевой (дистальной) части мантии, имеющей непосредственный контакт с внешней средой, в целом можно охарактеризовать как неспецифическую, свидетельствующую о некотором стрессе, испытываемом моллюсками в экспериментальных условиях. На это, в первую очередь, указывает угнетение фосфоноэстеразной активности и резкая активация альдолазы. Повышение альдолазной активности отражает увеличение вклада анаэробного распада углеводов в энергетический обмен мидий. Максимально активность альдолазы увеличивается в группе животных, содержащихся в воде, кондиционированной асцидиями *Styela rustica*, морскими звездами *Asterias rubens* и губками *Halichondria panicea*. Это позволяет предположить, что здесь имеет место изоляция мидий от окружающей среды с целью минимизировать воздействие присутствующих в воде экскреторно-секреторных продуктов этих животных либо, в случае с *A. rubens*, защититься от хищника.

Кроме того, интересно отметить, что в собственно мантии мидий, сохранившихся в воде, кондиционированной морскими звездами, наблюдается значительное повышение активности практически всех цитоплазматических и лизосомальных ферментов. Как известно, основной функцией мантии является построение раковины. Такой метаболический всплеск в данной ткани, возможно, отражает защитную стратегию моллюсков, направленную на укрепление раковины в присутствии хищника.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что для изучения аллелопатической составляющей внутривидовой и межвидовой конкуренции исследования только нуклеазной активности недостаточно, необходимо комплексное исследование биохимических показателей, позволяющее более полно оценить изменения метаболических процессов организма.

Глава 6. Альтерации спектра множественных молекулярных форм кислой дезоксирибонуклеазы под действием различных факторов среды

Явление молекулярного полиморфизма служит проявлением узкой специализации ферментов и является важным звеном в регуляции клеточного обмена. В частности, множественные формы отдельного фермента могут отвечать за альтернативные пути обмена, прямую и обратную реакцию, изоформы могут различаться по каталитическим характеристикам, термостабильности, чувствительности к действию модуляторов активности различной природы. Кроме того, гормоны и другие биологически активные вещества могут оказывать влияние не на все, а лишь на определенные изоформы. В связи с этим, изучение альтерации спектров множественных молекулярных форм ферментов может применяться в экологических исследованиях, позволяя охарактеризовать изменение биохимических процессов в тканях животных под действием тех или иных факторов среды.

В представленной главе приведены результаты исследований изменения состава множественных форм кислой ДНКазы водных животных, более адекватно реагирующей на внешние влияния, по сравнению с РНКазой.

Изучение спектра изоформ лизосомальной ДНКазы окуня *Perca fluviatilis* L. из озер Северной Карелии (Кривое и Жемчужное (подробное описание водоемов дано в главе 4.1.)), отличающихся уровнем аккумуляции ртути в тканях, показало, что печени и жабрам рыб присущ свой набор множественных молекулярных форм фермента (рис. 10). Кроме того, в гетерогенности кислой ДНКазы печени наблюдается выраженная половая специфичность. Самки характеризуются большим разнообразием молекулярных форм фермента, чем самцы, что лишний раз свидетельствует в пользу повышенной устойчивости данного пола к неблагоприятным воздействиям.

Наличие большого количества форм позволяет осуществлять катализ в широком диапазоне варьирования параметров микросреды клетки, в которой функционирует фермент, таких как: изменение pH, ионного состава, доступности субстрата, присутствия эффекторов и др. (Хочачка, Сомеро, 1988). И наоборот, выпадение активности тех или иных молекулярных форм фермента снижает вероятность эффективной компенсации внешних воздействий. Так, в жабрах окуней из озера Жемчужное с повышенным содержанием ртути в тканях, наряду со снижением общей активности ДНКазы, наблюдается исчезновение двух полос нуклеазной активности в энзимограммах.

Изучали качественные и количественные перестройки спектра белков, обладающих способностью гидролизовать ДНК, белеморских моллюсков *Mytilus edulis* L. под влиянием нефтепродуктов и различной солености среды. Для анализа использовали гомогенаты целых моллюсков.

Сравнительный анализ результатов фракционирования выявил индукцию активности дополнительных, не обнаруживаемых у контрольных моллюсков, форм ДНКазы. При соленостных адаптациях на энзимограммах фермента появляются новые изоформы с высокой электрофоретической подвижностью (R_f в интервале 0,6 – 0,8), тогда как, под действием нефтепродуктов основные отличия наблюдаются в зоне медленномигрирующих компонентов (R_f 0,3 – 0,4). Однако, помимо различий в приспособительных реакциях прослеживаются и общие черты, в частности, и в том и в другом случае, максимальное количество фракций кислой ДНКазы отмечено при так называемом «умеренном» воздействии изучаемого фактора.

Следует отметить, что даже в контрольных группах сублитеральных мидий при содержании в одинаковых условиях, максимально приближенных к параметрам естественной среды обитания, наблюдаются различия в наборе изоформ кислой ДНКазы. В токсикологическом эксперименте регистрируется дополнительная полоса нуклеазной активности в области медленнодвижущихся компонентов. Возможно, это отражает сезонную динамику изучаемых показателей, т. к. описанные исследования проводились в разное время года.

Очевидно, что биологический смысл полиморфизма ферментов заключается в повышении эффективности биохимической адаптации путем тонкой настройки метаболических функций в соответствии с изменениями условий среды. Однако, судя по отсутствию качественных изменений состава кислой ДНКазы, приспособительные реакции литеральных моллюсков имеют иную направленность. Долговременное обитание в среде, характеризующейся четко выраженной периодичностью колебаний ключевых факторов, приводит к синхронизации обменных процессов моллюсков с присущей данной акватории приливно-отливной ритмикой (Хлебович, 1981). Вследствие этого, основной адаптивной стратегией литеральных мидий является пережидание неблагоприятного воздействия с максимальной экономией энергетических и пластических ресурсов организма за счет снижения общего уровня метаболизма.

При критической для морских организмов солености (5 ‰), у моллюсков происходит, по всей видимости, нарушение конформации или структуры фермента, вследствие чего основные изоформы кислой ДНКазы (R_f 0,16 и 0,24) на энзимограммах выходят одним широким пиком активности с промежуточным значением R_f , равным 0,2.

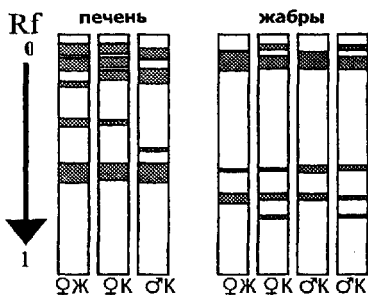


Рис. 10. Схема энзимограмм множественных форм кислой ДНКазы окуней из озера Жемчужное (Ж) и Кривое (К).

ВЫВОДЫ

1. Сравнительное изучение активности лизосомальных нуклеаз у ряда видов рыб не выявило связи между уровнем нуклеазной активности и видовой принадлежностью объекта. Исследованные виды пресноводных и морских рыб обнаруживают сходное распределение активности кислых нуклеаз в разных органах и тканях. Наибольшая рибо- и дезоксирибонуклеазная активность присуща активно метаболизирующим органам – печени, почки и гонады половозрелых самцов.

2. Выявлено изменение общей активности кислых нуклеаз, фракционного состава и перераспределение активности между отдельными изоформами ДНКазы под действием естественных и антропогенных факторов у рыб и беспозвоночных. Активация лизосомальных нуклеаз направлена на реализацию компенсаторных перестроек нуклеинового и, тесно связанного с ним, белкового обмена, а также освобождение клеток от модифицированных макромолекул. Степень активации нуклеаз зависит от природы и силы действующего фактора.

3. Характер варьирования нуклеазной активности лизосом у рыб и водных беспозвоночных при изменении условий обитания указывает на различие стратегий адаптации, обусловленных, помимо таксономической принадлежности, особенностями биологии организмов.

4. Ингибирование кислых нуклеаз токсикантами (в первую очередь, тяжелыми металлами) приводит к снижению адаптивных возможностей организма, уменьшая возможность выживания и успешного размножения.

5. Высокая чувствительность лизосомальных нуклеаз водных организмов к различным типам антропогенного загрязнения позволяет использовать определение активности и молекулярной гетерогенности кислых нуклеаз для оценки состояния гидробионтов в условиях техногенной трансформации водных экосистем.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Морозов Д.Н., Высоцкая Р.У., Амелина В.С. Влияние загрязняющих веществ различной природы на активность нуклеаз окуня *Perca fluviatilis* L. // Материалы Международной конференции «Экологические проблемы северных регионов и пути их решения». Апатиты, 2004. с. 69 – 71.

2. Амелина В. С., Ломаева Т. А., Морозов Д. Н. Активность кислых нуклеаз в тканях сига *Coregonus lavaretus* L. в условиях загрязнения воды отходами железорудного производства // Тез. докл. междунар. конф. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск, 2004. с. 12.

3. Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Амелина В. С., Веселов А. Е., Морозов Д. Н. Активность лизосомальных ферментов у молоди лосося, различающейся выбором участков обитания // Тез. докл. междунар. конф. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов», Петрозаводск, 2004. с. 26.

4. Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Амелина В. С., Веселов А. Е., Морозов Д. Н. Активность лизосомальных ферментов у молоди лосося, различающейся выбором участков обитания // Матер. междунар. конф. «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов», Петрозаводск, 2004. с. 32 – 35.

5. Амелина В. С. Активность кислых нуклеаз в тканях сига при загрязнении водоема отходами железорудного производства // Вестник молодых ученых. № 2. 2004. С. 93 – 95.

6. Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Шкляревич Г. А. Участие лизосомальных нуклеаз в адаптивных реакциях морских беспозвоночных // Матер. IX междунар. конф. «Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря». Петрозаводск, 2004. С. 27 – 31.
7. Амелина В. С., Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У. Биохимические механизмы устойчивости рыб северных водоемов к комплексным загрязнениям // Матер. IX междунар. конф. «Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря». Петрозаводск, 2004. с. 31 – 35.
8. Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Такшеев С. А., Амелина В. С., Бахмет И. Н. Активность лизосомальных и некоторых других ферментов в тканях мидий при разном уровне солености // Мат. IX междунар. конф. «Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря». Петрозаводск, 2004. С. 72 – 76.
9. Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А. Две стратегии адаптации беспозвоночных к различному типу антропогенного загрязнения // Матер. конф. мол. исследователей «Физиология и медицина». Санкт-Петербург, 2005. С. 7.
10. Амелина В. С. Возрастные особенности спектра лизосомальных нуклеаз в различных органах ряпушки *Coregonus albula* L. // Онтогенез. Т. 36. № 5. 2005. С. 369 – 370.
11. Амелина В. С. Влияние ртутного загрязнения на лизосомальные нуклеазы рыб // Тез. докл. XII молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии». Сыктывкар, 2005. С. 9 – 10.
12. Амелина В. С., Морозов Д. Н., Кашулин Н. А. Эффекты комплексного загрязнения водоема на некоторые биохимические показатели сига *Coregonus lavaretus* L. // Матер. конф. «Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (3. Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Ломаева Т. А., Такшеев С. А., Немова Н. Н. Влияние кислотности и ртутного загрязнения на активность ферментов в тканях окуня *Perca fluviatilis* L. // Матер. конф. «Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества). Петрозаводск, 2005. С. 85 – 88.
14. Амелина В. С. Влияние буровых растворов на активность кислых нуклеаз морских беспозвоночных // Тез. докл. междунар. конф. «Современные проблемы водной токсикологии», Борок, 2005. С. 5.
15. Высоцкая Р.У., Амелина В.С., Ломаева Т.А., Морозов Д.Н., Кашулин Н.А. Сравнительное изучение ферментных систем сига и ряпушки при загрязнении водоема отходами горноурдского производства // Тез. докл. междунар. конф. «Современные проблемы водной токсикологии», Борок, 2005. С. 25.
16. Амелина В. С. Роль лизосомальных нуклеаз в адаптациях морских организмов к изменению солености воды. // Матер. IV Междунар. конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера». Вологда, 2005. Ч. 1. С. 12 – 14.
17. Высоцкая Р.У., Амелина В.С., Ломаева Т.А., Шустова Н. К. Изучение влияния компонентов буровых растворов на активность ферментов беломорских мидий (*Mytilus edulis* L.) // Матер. IV Междунар. конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера». Вологда, 2005. Ч. 1. С. 94 – 95.
18. Амелина В. С. Роль лизосомальных нуклеаз в адаптациях беломорских мидий к опреснению воды. // Тез. докл. междунар. школы молодых ученых «Адаптации гидробионтов», Ростов-на Дону, 2005. С. 11.
19. Амелина В. С., Морозов Д. Н. Влияние стоков медно-никелевого производства на активность лизосомальных нуклеаз у рыб // Тез. докл. 10-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино: Пушкинский НИЦ РАН, 2006. С. 249.
20. Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Комов В. Т. Оценка состояния рыб в условиях ртутного загрязнения водоема по изменению нуклеазной активности лизосом

// Докл. Московского общества испытателей природы, т. 39: Биотехнология – охрана окружающей среды. Москва, 2006. С. 203.

21. Амелина В. С. Изменение электрофоретических спектров кислой ДНКазы мидий при различной солености // Матер. междунар. конф., посвящ. 60-летию КарНЦ, «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика». Секция «Биологические науки». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 36 – 37.

22. Высоцкая Р.У., Такшеев С. А., Немова Н. Н., Амелина В.С., Морозов Д. Н. О видоспецифичности биохимических реакций у рыб при разных типах антропогенного воздействия // Матер. междунар. конф., посвящ. 60-летию КарНЦ, «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика». Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. С. 75 – 78.

23. Высоцкая Р.У., Амелина В.С., Немова Н. Н., Стерлигова О. П. Роль ферментов в развитии адаптивных реакций у ряпушки (*Coregonus albula*) разных возрастных групп // Матер. Междунар. научной конф. «Инновации в науке и образовании – 2006». Калининград: Калининградский гос. технический университет, 2006. С. 78 – 79.

24. Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Халаман В. В. Использование биохимических показателей для оценки взаимовлияний животных в сообществах обрастания Белого моря // Матер. X Научной конф. ББС МГУ, пос. Пояконда. 2006. С. 18 – 21.

25. Высоцкая Р.У., Амелина В.С., Морозов Д. Н., Ломаева Т.А., Кашулин Н. А. Оценка методами энзимодиагностики резистентности рыб к загрязненному водоему отходами медно-никелевого производства // Мат. Междунар. конф. «Современные экологические проблемы Севера (к 100-летию со дня рождения О. И. Семенова-Тянь-Шанского)». Апатиты: ИППО Севера КНЦ РАН, 2006. С. 160 – 161.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 03.11.06.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,4. Печ. л. 1,6. Тираж 100 экз. Изд. № 76. Заказ 620.

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский отдел

