

На правах рукописи



**БОРВИНСКАЯ
Екатерина Витальевна**

**ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ РЫБ
ИЗ ОЗЕР СЕВЕРНОЙ КАРЕЛИИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2012

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра РАН (ИБ КарНЦ РАН)

Научный руководитель: доктор биологических наук
СМИРНОВ Лев Павлович

Официальные оппоненты: ШПАКОВ Александр Олегович,
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
заведующий лабораторией эндокринологии

БЕЛОЗЕРСКАЯ Татьяна Андреевна
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ведущий научный сотрудник

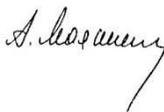
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Защита состоится «15» марта 2012 года в 12 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.087.02 при Карельской государственной педагогической академии по адресу: 185035, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельской государственной педагогической академии.

Автореферат разослан «__» февраля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент



А.И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Система ферментов биотрансформации ксенобиотиков была приобретена организмами в ходе эволюции для защиты внутренней среды от вредоносного действия экзо- и эндогенных метаболитов. Диапазон адаптивных возможностей организмов в неблагоприятных условиях среды напрямую определяется эффективностью, с которой они способны обезвреживать различные токсины. Важнейшим компонентом клеточного метаболизма, ответственным за индивидуальную чувствительность организма к токсичным веществам, являются глутатион S-трансферазы (Е.С.2.5.1.18) - большое семейство ферментов в составе системы биотрансформации ксенобиотиков (фаза II). Основная функция глутатион S-трансфераз (GST) заключается в обезвреживании электрофильных соединений, в том числе, образующихся в ходе окислительного стресса (Кулинский, 1999). Изучение этих ферментов имеет большое значение для клинической медицины, так как от них во многом зависит возникновение, течение и исход ряда онкологических заболеваний (Strange et al., 2001). С этим был связан повышенный интерес изучению свойств GST, что привело к большому количеству исследований, которые были выполнены на теплокровных позвоночных. В свою очередь данных об особенностях регуляции, структуре и функциях GST рыб существенно меньше и они в значительной мере носят фрагментарный характер. Вместе с тем, подобные исследования необходимы для понимания фундаментальных механизмов адаптации рыб к изменяющимся условиям среды. Кроме того, GST рыб могут применяться в качестве биомаркера для оценки качества среды и здоровья организмов в условиях возрастающей антропогенной нагрузки. Поэтому необходимость подобных исследований, в том числе для разработки стандартизированных программ эколого-биохимического мониторинга, не вызывает сомнений.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в характеристике глутатион S-трансфераз в тканях пресноводных рыб и изучении влияния некоторых антропогенных факторов на активность исследуемых ферментов.

Основные задачи настоящей работы заключались в следующем:

- определить активность GST у плотвы, сига и щуки в зависимости от пола, возраста;
- выявить органо-тканевую специфику активности GST;
- изучить активность GST в органах щуки, сига и плотвы из водоемов с разным уровнем антропогенного воздействия;
- выделить GST из печени щук, охарактеризовать ее структурные и каталитические особенности.

Личное участие автора в получении результатов научных исследований, изложенных в диссертации. Автор принимал участие в экспедиционных работах по сбору объектов. Обработка материала исследования, проведение лабораторных экспериментов и статистического анализа полученных данных, обсуждение, интерпретация и обобщение полученных результатов, формулировка выводов, написание научных статей выполнены автором лично.

Научная новизна. Впервые получены данные по активности GST в органах щук, сига и плотвы из водоемов расположенных в зоне промышленной добычи железной руды и обнаружено влияние техногенного загрязнения на этот показатель. Изучена естественная вариабельность данного фермента у щуки, сига и плотвы в зависимости от физиологического статуса рыб. Впервые проведена оценка субстратной специфичности GST из тканей щуки и сига. Проведено выделение и очистка GST из печени щуки и частично охарактеризованы её структурные и каталитические особенности.

Практическое значение работы. Работа является частью многолетних исследований, проводимых в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН в рамках программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг., гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-894.2003.4; НШ-3731.2010.4) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие на 2009-2011 гг.». Полученные в ходе работы результаты могут быть интегрированы в систему эколого-биохимического мониторинга и тестирования пресноводных экосистем. Материал может быть использован при чтении курса лекций «Экологическая биохимия животных» для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Положения, выносимые на защиту:

1. На активность GST оказывает влияние видовая принадлежность, пол, возраст и органо-тканевая специфика.

2. GST исследованных видов рыб участвуют в развитии ответной реакции организма рыб на изменение среды, вызванное техногенной трансформацией водоема.

3. GST печени щуки является типичным представителем семейства глутатион S-трансфераз. По субстратной специфичности этот фермент наиболее сходен с GST классов **ρ** , **π** и **α** .

Апробация работы. Основные результаты исследования были доложены и обсуждены на 7 международных и 3 всероссийских конференциях: XVI Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2009); международной конференции в Москве «17th International Environmental Bioindicators Conference», XXVIII международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Петрозаводск, 2009), международной научно-практической конференции в Мурманске "Сохранение биологического разнообразия наземных и морских экосистем в условиях высоких широт", IV международной конференции «Balwois – 2010. Water observation and information system for decision support» (Ohrid, Republic of Macedonia, 2010), III международной конференции с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2010), международном научно-практич. семинаре с элементами школы для молодых ученых «Биологические ресурсы Арктики и Субарктики – потенциал для биотехнологии: исследования и инновации» (Петрозаводск, 2010), международной научной конференции «Природа морской Арктики: современные вызовы и роль науки» (Мурманск, 2010), V Всероссийском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011), I Всерос. конференции с межд. участием "Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов" (Борок, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 5 статей, из них 3 из перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, включая 23 рисунка и 22 таблицы. Список литературы включает 220 источников, из них 30 отечественные.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н. Льву Павловичу Смирнову, директору Института биологии КарНЦ РАН, член-корр. РАН, проф., д.б.н. Немовой Н.Н. Благодарю за помощь в работе и ценные рекомендации сотрудников лаборатории ихтиологии и паразитологии Института биологии КарНЦ РАН. Искренне признательна всем сотрудникам лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН за постоянную помощь и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены современные сведения о структуре, биологической роли и разнообразии ферментов в составе семейства глутатион S-трансфераз. Подробно рассмотрены особенности GST рыб и их современная классификация. Обобщены данные литературы об участии GST в механизмах эколого-биохимических адаптаций в условиях изменения различных факторов окружающей среды, включая антропогенные.

Глава 2. Материал и методы исследования

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использовали следующие виды рыб: щуку *Exos lucius*, сига *Coregonus lavaretus* и плотву *Rutilus rutilus*. Сбор материала проводили в ходе ежегодных экспедиций в июне 2009-2011 гг. Отлов рыбы осуществляли сетями по общепринятой методике (Правдин, 1966).

Число особей сигов, отловленных в различных водоемах, варьировало от 6 до 16 в год, щук 6-11, плотвы 6-8. Возраст рыб составлял 2-14 лет для сига, 2-14 лет щуки и 3-12 лет для плотвы.

Собирали половозрелых особей различных возрастных групп. Сразу после вылова рыба была измерена и взвешена, органы извлечены и заморожены в жидком азоте. Материал до анализа хранили при -80°C.

Характеристика места сбора материала.

Озеро Костомукшское (хвостохранилище) – верхнее озеро левого притока р. Кемь, зарегулированное дамбой и превращенное в хвостохранилище Костомукшского ГОКа. Массированный сброс в озеро измельченной горной породы (хвостов обогащения) повлек за собой изменение основных физико-химических условий в водоеме. За время эксплуатации ГОКа произошло резкое увеличение общей минерализации воды с 25 мг/л в 1978 г. до 750 мг/л в 2011 г. Большую часть отходов составляют калий (172 мг/л) и сульфаты (350 мг/л). Из биогенных элементов наибольший сброс у нитратов (14 г/л) (Оценка состояния..., 2011). Содержание нефтепродуктов в хвостохранилище достигает 0,07 мг/л, т.е. на уровне ПДК (Поверхностные воды..., 2001). В составе техногенных вод содержатся тяжелые металлы, в особенности никель, железо, марганец, медь, ртуть и др., тем не менее, превышение ПДК зафиксировано только по марганцу и молибдену (Оценка состояния..., 2011). В целом, загрязнение озера отходами горно-обогатительного производства можно охарактеризовать как преимущественно минеральное (Поверхностные воды..., 2001).

Озеро Окуновое. Предназначено для регулируемого сброса вод хвостохранилища с целью предотвращения его переполнения и прорыва пло-

тины (Поверхностные воды., 2001). Как и в озере Костомукшское воды оз. Окуновое характеризуются повышенной минерализацией, увеличением концентрации ионов калия (156 мг/л) и сульфатов (306 мг/л), нарушением природного соотношения между ионами (Оценка состояния., 2011).

Озеро Каменное – верхнее озеро правого притока р. Кемь. Водоем расположен на территории Костомукшского государственного заповедника и относительно свободен от антропогенного влияния. В данном исследовании был принят за контрольный водоем. Вода в озере Каменное характеризуется низкой минерализацией (9.5 мг/л) и низким содержанием органических соединений (Ильмаст, 2010).

Методы исследования. Замороженные образцы ткани рыб гомогенизировали в 0,125 М калий-фосфатном буфере (pH 6.5), после чего центрифугировали при 110000 g в течение часа при 4°C. В полученном супернатанте активность GST определяли спектрофотометрически согласно описанным методикам по скорости связывания восстановленного глутатиона (GSH) со следующими субстратами: 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB), 1,2-дихлор-4-нитробензолом (DCNB), этакриновой кислотой (EtA), 4-нитрохинолин N-оксидом (NNO), транс-4-фенил-3-бутен-2-оном (tPB) и транс-стильбен оксидом (tSO) (Habig et al., 1974; Stanley, Bensen, 1988; Ivarsson et al., 2002). Измерения проводили при 20°C. За 1 усл. ед. активности GST принимали количество nM комплекса субстрат - GSH, которое образуется за 1 мин. Относительную активность GST выражали в пересчете на количество растворимого белка в ткани (ед. акт./мг белка).

Очищенный препарат глутатион S-трансферазы из печени шук получали хроматографическими методами. Гель-фильтрацию осуществляли на носителе Sephadex G-100 (Pharmacia) в 0,013М фосфатном буферном растворе (pH 7.3). Аффинную хроматографию осуществляли на носителе Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Helthcare, Швеция), используя на этапе связывания 0,013М фосфатный буфер (pH 7.3), на этапе элюции 0,05 М Трис-HCl буфер (pH 9.0), содержащий 0,05М восстановленного глутатиона.

Для определения кинетических констант GST использовали варьирующие концентрации субстрата CDNB (0,1-2,5 мМ) и насыщающую концентрацию глутатиона (5 мМ). Измерения проводили при температуре 25°C. Значения Km и Vmax были получены из уравнения гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата $y = V_{max} * x / (x + K_m)$, подобранного для экспериментальных данных с помощью программы Origin 8.5.

Молекулярную массу очищенного фермента определяли методом SDS-электрофореза в блоке полиакриламидного геля по стандартной методике (Laemmli, 1970). Изоэлектрическое фокусирование белка осуществляли в

полиакриламидном геле (T5%, C4%), содержащем 2% фармалитов (диапазон рН 3-10). Окрашивание белковых полос проводили азотнокислым серебром (Heukeshoven, Deric, 1985).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 7 и Statgraphics Plus. Статистическую значимость различий оценивали по непараметрическому критерию U Манна - Уитни. Для оценки степени влияния факторов на активность GST использовали многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA). С целью выявления зависимости между исследуемыми параметрами применяли корреляционно-регрессионный анализ (Юнкеров, Григорьев, 2002). Порог доверительной вероятности во всех случаях принят равным 0.95, с уровнем значимости $p < 0.05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Влияние эколого - физиологических факторов на активность GST рыб

3.1.1. Видовая и тканевая специфичность активности GST рыб

Активность глутатион S-трансфераз была исследована в органах шук, плотвы и сига, видов представляющих различные звенья пищевой цепи в северных пресноводных водоемах. В таблице 1 приведены данные об уровне активности GST в тканях этих рыб, полученные по стандартной методике с использованием субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола

Таблица 1

Активность GST в присутствии CDNB в тканях изученных видов рыб (ед.акт./мг белка)

вид	жабры	мышцы	печень	почки
щука	625 ± 96	8 ± 2	831 ± 140	41 ± 16
сиг	12 ± 3	9 ± 2	81 ± 9	44 ± 15
плотва	39 ± 12	7 ± 3	97 ± 16	17 ± 5

(CDNB). CDNB является универсальным субстратом с которым реагируют практически все известные изоформы фермента, поэтому его применение позволяет оценить суммарную активность глутатион S-трансфераз в клетке. Самый высокий уровень активности

у всех рыб наблюдали в печени, минимальная активность обнаружена в мышцах. Такое распределение отражает функциональное значение печени как органа, через который проходят основные потоки ксенобиотиков, поступающих в организм, тогда как участие мышц в метаболизме вредных веществ незначительно.

Самые высокие значения активности в присутствии CDNB были получены в печени и жабрах щуки, в которых она была в 10 - 92 раза выше (таб. 1), чем в соответствующих тканях сига и плотвы. Вероятно это свидетельствует о различном содержании GST в органах этих видов. Исходя

из того, что рыбы, у которых выше уровень активности фермента, вероятно, более защищены от воздействия ксенобиотиков, можно предположить, что высокий уровень активности GST в тканях щуки, стоящей на вершине пищевой пирамиды в северных пресных водоемах, может быть приспособлением, выработанным в ходе эволюции для защиты от накопления токсинов в пищевой пирамиде.

3.1.2. Зависимость активности GST от пола

Выраженная половая специфика активности GST была обнаружена только в почках щук (таб. 2). В 2009 и 2011 г. активность в присутствии универсального субстрата CDNB была в среднем в 3 раза выше у самок по сравнению с самцами.

Таблица 2

Активности GST в почках щук в зависимости от пола рыб (ед. акт./мг белка)

водоем	2009 г.		2010 г.		2011 г.	
	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
оз. Каменное	18 ± 7	10 ± 3	40 ± 13	39 ± 15	87 ± 5	36 ± 7*
оз. Костомукшское	109 ± 9	34 ± 6*	41 ± 17	65 ± 9	63 ± 15	10 ± 5*

*-различия статистически значимы по сравнению с самками ($p < 0.05$).

При этом в 2010 г. подобных различий не выявлено. Полученные данные указывают на наличие механизмов гормональной регуляции некоторых изоформ GST (Hatayama et al., 1986; Awasthi et al., 1993; Mitchel, 1997).

3.1.3. Влияние возраста на активность GST

Влияние возраста на показатели активности GST проявляется не однозначно и зависит от ткани и вида рыбы. Наличие значимой отрицательной корреляции возраста и активности GST было получено в почках, печени и жабрах плотвы из озера Каменное и в печени и жабрах плотвы из оз. Костомукшское (таб. 3), а также в печени сегов из обоих озер ($r_s = -0.45$). В отличие от сегов и плотвы, показатели активности GST в печени, жабрах и почках у щук не изменяются по мере роста рыб, тогда как в мышцах происходит увеличение активности. В других тканях изученных рыб не было обнаружено возрастных изменений активности GST.

Если судить по значениям коэффициентов корреляции, то выявленные возрастные изменения, более выражены у рыб из озера Каменное, чем у рыб из оз. Костомукшское (таб. 3). Однако анализ не показал статистически значимых различий у рыб из обоих озер.

Таблица 3

Зависимость активности GST от возраста рыб

вид	место вылова	коэффициент корреляции, r_s	уравнение регрессии	коэфф. детерминации, R^2
почки	оз. Каменное	-0.57*	$y = -4,40x + 56,84^*$	0.36
плотвы	оз. Костомукшское	-0.47	$y = -5,94x + 50,68$	0.15
печень	оз. Каменное	-0.50*	$y = -6,69x + 140,3^*$	0.23
плотвы	оз. Костомукшское	-0.47*	$y = -9,05x + 149,4$	0.10
жабры	оз. Каменное	-0.46*	$y = -5,94x + 79,99^*$	0.28
плотвы	оз. Костомукшское	-0.47*	$y = -10,65x + 102,2$	0.16
печень	оз. Каменное	-0.60*	$y = -8,66x + 129,7^*$	0.26
сигов	оз. Костомукшское	-0.45*	$y = -2,69x + 97,09$	0.03
мышцы	оз. Каменное	0.60*	$y = 1,01x + 1,34^*$	0.44
щук	оз. Костомукшское	0.49*	$y = 1,36x + 1,96^*$	0.28

*-зависимость статистически значима при $p < 0.05$.

3.1.4. Субстратная специфичность активности GST

Помимо универсального субстрата CDNB, при определении активности GST использовали набор из пяти различных субстратов специфичных для некоторых классов GST. Это позволяет оценить вклад отдельных изоформ в общую глутатион трансферазную активность.

Полученные результаты свидетельствуют, о том что GST щуки, плотвы и сига на уровне органов и тканей значительно отличаются по способности метаболизировать химические соединения различной структуры. Это, вероятно, связано с различиями в изоферментном профиле GST тканей этих рыб.

Таблица 4

Активность GST с различными субстратами в тканях щуки
(ед. акт./мг белка)

Субстрат	жабры	мышцы	печень	почки, самки	почки, самцы
CDNB	444 ± 82	10 ± 1	742 ± 133	87 ± 5	36 ± 3
NNO	23 ± 8	н.о.	40 ± 5	н.о.	
DCNB	н.о.	н.о.	н.о.	10' 0-31	
EtA	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	
tPB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	
tSO	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	

¹ - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний;
]скобкой обозначены показатели активности значимо коррелирующие между собой.

У жуки в жабрах и печени обнаружена активность GST в присутствии субстрата NNO, которая, однако, отсутствует в почках и мышцах (таб. 4). Помимо этого, в почках некоторых жуков обнаруживается активность с субстратом DCNB (разброс активности 0-89 ед. акт./мг белка, со значением медианы равным 2 ед. акт./мг белка). Не ясно, являются ли эти значения артефактами, возникшими в ходе эксперимента, или отражают генетический полиморфизм особей.

Иным был профиль активности GST с различными субстратами у сига (таб. 5). В печени сига происходит каталитическое связывание глутатиона с субстратами NNO, DCNB и EtA, при этом с последним субстратом активность GST по уровню превосходит активность с CDNB. Высокий уровень активности GST с EtA характерен для представителей семейства лососеобразные и связан с экспрессией у них преимущественно изоформ GST класса π , характеризующихся высоким сродством к этому субстрату (Nóvoa-Valiñas et al., 2002; Donham et al., 2005; Trute et al., 2007).

Таблица 5

Активность GST с различными субстратами в тканях сига (ед. акт./мг белка)

Субстрат	жабры	мышцы	печень	почки
CDNB	13 ± 4	6 ± 2	46 ± 9	45 ± 12
NNO	н.о.	н.о.	12 ± 3	н.о.
DCNB	28 ± 8	н.о.	9 ± 5	107 ± 31
EtA	н.о.	н.о.	96 ± 22	н.о.
tPB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
tSO	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

¹ - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний;

] скобкой обозначены показатели активности значимо коррелирующие между собой.

В почках сигов обнаружена высокая активность GST в присутствии субстрата DCNB, которая почти в три раза выше, чем активность в присутствии CDNB. Если судить по доступной нам литературе, это является уникальным каталитическим свойством данной GST (Hays, 1986; Manner- vik, Danielson, 1988; Hayes et al., 2005; Šetlíková, Wiegand, 2009).

У плотвы во всех изученных тканях катализируется конъюгация с глутатионом субстрата NNO (таб. 6). Каталитическая реакция с EtA осуществляется в печени, почках и жабрах плотвы, однако в последних наблюдается значительная индивидуальная изменчивость этого показателя: в жабрах плотвы активность варьирует от полного отсутствия до 91 ед. акт./мг белка, со значением медианы равным 24, в почках от 0 до 49 ед. акт./мг белка, с медианой равной 12. Активность в присутствии субстрата DCNB была обнаружена в почках и в печени плотвы.

Таблица 6

**Активность GST с различными субстратами в тканях плотвы
(ед.акт./мг белка)**

Субстрат	жабры	мышцы	печень	почки
CDNB	14 ± 5	5 ± 1	87 ± 21	15 ± 3
NNO	9 ± 5	$\frac{5'}{0-7}$	23 ± 9	11 ± 5
DCNB	н.о.	н.о.	$\frac{4'}{1-10}$	5 ± 2
EtA	$\frac{24'}{6-91}$	н.о.	52 ± 15	$\frac{16'}{0-49}$
tPB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
tSO	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

¹ - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний.

В жабрах щуки индивидуальные показатели активности GST с субстратами CDBN и NNO у различных особей значимо коррелируют между собой ($r_s = 0.81$). У сига подобная взаимосвязь, хотя и слабее по силе, наблюдается в печени между показателями активности GST с субстратами NNO и DCNB ($r_s = 0.42$), и NNO и CDBN ($r_s = 0.47$). Учитывая широкую субстратную избирательность глутатион S-трансфераз, эти результаты могут отражать активность одной изоформы GST, способной метаболизировать несколько субстратов, либо указывают на наличие единого механизма регуляции для нескольких изоформ фермента.

Выявленные различия отражают специфическую активность наборов изоформ, характерных для отдельных тканей. Установленные различия изоферментных спектров GST могут быть связаны как с физиологическими особенностями, так и с таксономической принадлежностью изучаемых объектов.

3.1.5. Активность GST у рыб из водоемов подвергшихся техногенной трансформации.

Изучение активности GST в тканях рыб, выловленных из озера Костомукшское, показало, что эти ферменты могут принимать участие в развитии ответной реакции организма рыб на изменение среды обитания, вызванное техногенной трансформацией водоема. При этом ответ на воздействие у каждого вида рыб проявляется по-разному (рис. 1).

В жабрах щуки из оз. Костомукшское обнаружена устойчивая активация фермента, активность которого превышала контрольные значения в 2009, 2010 и 2011 гг. в 1,7-1,8 раз (рис. 1). Повышенная активность также наблюдалась в мышцах щук из хвостохранилища. В почках рыб из за-

грязненного водоема обнаружено постепенное снижение активности GST за трехлетний период наблюдений: в 2009 г. этот показатель у самцов и самок из хвостохранилища многократно превышал таковой у рыб из контрольного водоема (3 и 6 раз соответственно), в 2010 г. активность GST в почках самцов была на уровне контроля, а в 2011 году у обоих полов ниже, чем у рыб из оз. Каменное. В свою очередь, в печени шук заметных изменений активности GST не обнаружено.

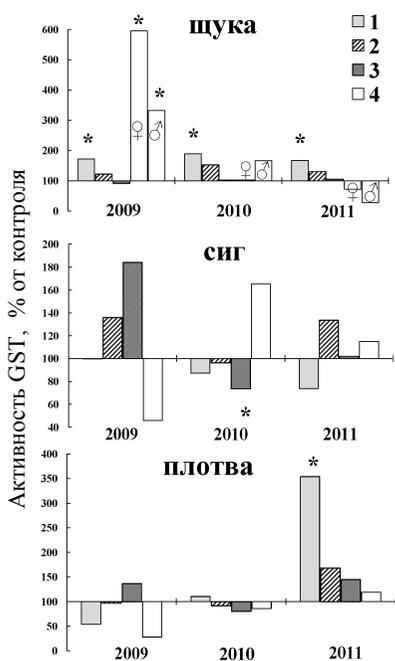


Рис. 1. Активность GST в тканях исследованных рыб, выловленных в 2009 – 2011 гг. из опытного водоема (оз. Костомукшское) по отношению к контролю (оз. Каменное):

1 - жабры; 2 – мышцы; 3 – печень; 4 – почки.
* - различия между опытом и контролем статистически значимы при $p < 0.05$
♀ - самки, ♂ - самцы

В тканях сига также наблюдали изменения активности GST у рыб из оз. Костомукшское по сравнению с рыбами из оз. Каменное (рис. 1). Тем не менее, анализ показал наличие статистически значимых различий только в печени сигов в 2010 г., где активность была снижена относительно контроля, и заметное, но статистически не значимое ($p = 0.08$) повышение активности в почках сигов в 2010 г. Однако в 2009 г. тенденция имела противоположный характер: активность в печени сигов была выше, чем в контроле, а в почках ниже. Таким образом, показатели активности GST в этих органах сига в значительной мере подвержены колебаниям под действием совокупности факторов, действующих в разные годы. Это не позволяет сделать однозначные выводы о вкладе в эту изменчивость воздействию непосредственно техногенного загрязнения. В жабрах сигов из хвостохранилища в период с 2009 по 2011 г. наблюдалась некоторая тенденция к постепенному снижению активности GST по сравнению с рыбами из оз. Каменное.

У плотвы из оз. Костомукшское заметное изменение активности GST зафиксировано в 2011 г. в жабрах рыб (в 3,5 раз больше чем в контроле). При этом обращает на себя внимание тенденция к увеличению активности за период трехлетнего наблюдения, так как в 2010 г. уровень активности GST был

близок к контрольному, а в 2009 г. был ниже, чем в оз. Каменное (рис. 1). Можно предположить, что происходило усиление действия совокупности негативных факторов на жабры плотвы, которое к 2011 г. достигло максимального уровня. В почках и мышцах плотвы активность GST в 2011 г. была также выше, чем в 2009 г. и 2010 г.

Полученные результаты показывают, что при проведении эколого-биохимического мониторинга важно подобрать подходящие виды биоиндикаторы. Среди изученных рыб показатели активности GST щуки отличались наибольшей чувствительностью и стабильно воспроизводились в разные годы. Данный вид рыб является типичным обитателем внутренних водоемов Севера, что делает его доступным объектом для эколого-токсикологического тестирования данного региона.

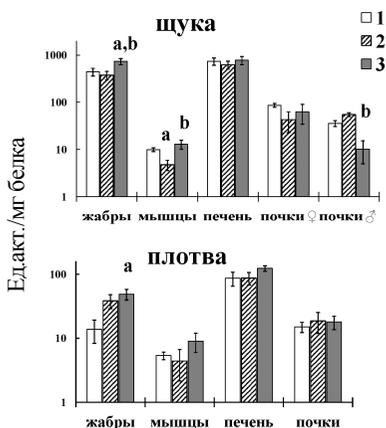


Рис. 2. Активность GST в тканях щуки и плотвы из озер с разной степенью антропогенного загрязнения:

1 – оз. Каменное; 2 – оз. Окуновое; 3 – оз. Костомукшское

a – различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Каменное

b – различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Окуновое

♀ - самки, ♂ - самцы

под действием естественных причин, о чем свидетельствует значимая корреляция между этими показателями у рыб из оз. Каменное и оз. Костомукшское ($r_s = 0.60$ и 0.49 , соответственно).

У плотвы из оз. Окуновое суммарная активность GST была повышена в жабрах, однако различия с контролем были менее выражены ($p = 0.07$), чем в жабрах плотвы из оз. Костомукшское (рис. 2). Таким образом, на-

В отличие от рыб из оз. Костомукшское, изменения активности GST не обнаружены у щук из озера Окуновое: в жабрах, печени и почках суммарная активность в присутствии универсального субстрата CDNB была на уровне контроля, тогда как в мышцах даже существенно ниже, чем в оз. Каменное и хвостохранилище (рис. 2). Вероятно, техногенное воздействие на GST щук в оз. Окуновое проявляется значительно слабее, чем в оз. Костомукшское, и не достигает уровня, при котором происходит защитная активация ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков.

Низкая активность GST в мышцах щук из оз. Окуновое, вероятно, связана с тем, что среди рыб, выловленных из этого озера в ходе экспедиции, преобладали особи более младших возрастов (2-6 лет), чем в других водоемах (4-14 лет). Повышение активности GST с увеличением возраста в мышцах щук происходит

блюдается тенденция к снижению активности GST в этой ткани по мере удаления от источника загрязнения. В других тканях плотвы из оз. Окуноево заметных изменений активности не обнаружено.

Можно заключить, что наиболее сильный сдвиг показателей активности фермента наблюдается у рыб из оз. Костомукшское, превращенного в хвостохранилище Костомукшского ГОКа, тогда как в оз. Окуноево изменения менее выражены, что указывает на уменьшение техногенного воздействия в водоеме, расположенном ниже по течению. Это можно объяснить как разбавлением техногенных вод, так и существенным различием между водоемами: оз. Окуноево свободно сообщается с нижележащими озерами, рыба из него может совершать миграции, избегая, таким образом, хронического воздействия техногенных вод.

Полученные результаты показывают, что применение серии специфических субстратов при определении активности глутатион S-трансфераз позволяет с большей долей вероятности выявить ответную реакцию на воздействие загрязнения, чем при использовании стандартной методики с применением универсального субстрата CDNB.

Таблица 7

Активность GST с различными субстратами (ед. акт./мг белка) в тканях щук, выловленных их озер в разной степени подверженных антропогенному загрязнению

Субстрат	жабры			мышцы			печень			почки		
	Оз. Каменное	Оз. Окуноево	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окуноево	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окуноево	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окуноево	Оз. Костомукшское
NNO	23±8	34±5	63±18 ^{a,b}	н.о.	н.о.	н.о.	40±5	33±9	55±9 ^{a,b}	н.о.	н.о.	н.о.
DCNB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	$\frac{10'}{0-31}$	$\frac{0'}{0-17}$	$\frac{4'}{0-89}$

a – различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Каменное;

b - различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Окуноево;

' - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний.

Так, было обнаружено значительное повышение активности GST в присутствии NNO в печени щук (таб. 7) и в присутствии NNO и DCNB в печени сига (таб. 8), в то время как показатели активности в присутствии DCNB в этом органе не отличались от контроля. Подавление активности изоформы GST, способной конъюгировать глутатион с

DCNB, было показано в жабрах сига (таб. 8). Это означает, что в ответной реакции на изменение среды обитания участвуют не все, а только некоторые, наиболее чувствительные изоформы фермента. Поэтому активность с этими субстратами может быть предложена в качестве кандидата на роль специфических маркеров загрязнения определенного типа, которое характерно для вод хвостохранилища.

Таблица 8

Активность GST с различными субстратами (ед. акт./мг белка) в тканях сига, выловленных из озер в разной степени подверженных антропогенному загрязнению

Субстрат	жабры		мышцы		печень		почки	
	Оз. Каменное	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Костомукшское
NNO	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	12±3	20±6 ^a	н.о.	н.о.
EtA	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	94±22	116±13	н.о.	н.о.
DCNB	28±8	16±6 ^a	н.о.	н.о.	9±5	31±12 ^a	107±31	154±60

н.о. – активность не определяется при заданных условиях эксперимента;

a – различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Каменное.

Также как и суммарная активность GST в присутствии CDNB, активность в присутствии специфических субстратов у щук и плотвы из оз. Окуновое не отличалась от контроля. Исключение составляет печень плотвы из оз. Окуновое, где обнаружена более низкая активность изоформы GST метаболизирующей субстрат EtA, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с рыбами из хвостохранилища (таб. 9). В остальных тканях плотвы из изученных озер значительных различий активности GST в присутствии использованных субстратов не было выявлено.

Какой фактор техногенной нагрузки из действующих на ихтиофауну озера Костомукшское (или их комплекс) является ведущим до конца не ясно. Полученные результаты могут отражать процессы адаптации органов водно-солевого обмена рыб к повышенной нагрузке в условиях аномальной минерализации техногенных вод хвостохранилища. Также модифицирующее действие на активность GST может быть адаптивным процессом, позволяющим биологическим системам частично или полностью

преодолевать окислительный стресс, вызванный тяжелыми металлами, поступающими в хвостохранилище в составе отходов производства. Накопление меди и никеля было ранее показано в тканях шук из оз. Костомукшское (Такшеев, 2005). Кроме того, в составе воды хвостохранилища встречаются нефтепродукты, концентрация которых не превышает ПДК (<0,05 мг/л), однако их влияние на активность GST нельзя исключать, особенно учитывая то, что некоторые компоненты нефти являются непосредственными субстратами фермента. Еще одним фактором, оказывающим значительное воздействие на состояние рыб, может быть наличие большого количества минеральной взвеси в воде оз. Костомушское. Мелкие частицы породы могут повреждать эпителий жабр рыб, приводить к их хроническому воспалению и угнетению дыхательной функции (Алабастер, Ллойд, 1984). С этим утверждением согласуется отсутствие выраженной реакции GST на воздействие техногенной воды в оз. Окунеевое, в которой содержится значительно меньше взвешенных частиц.

Таблица 9

Активность GST с различными субстратами (ед. акт./мг белка) в тканях плотвы, выловленной из озер в разной степени подверженных антропогенному загрязнению

Субстрат	жабры			мышцы			печень			почки		
	Оз. Каменное	Оз. Окунеевое	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окунеевое	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окунеевое	Оз. Костомукшское	Оз. Каменное	Оз. Окунеевое	Оз. Костомукшское
NNO	9±5	8±2	13±3	5' 0-7	3' 0-10	4' 3-7	23±9	24±5	36±14	11±5	10±2	8±2
EtA	24' 6-91	12' 0-56	24' 0-35	н.о.	н.о.	н.о.	52±15 ^а	14±4	59±11 ^а	16' 0-49	8' 0-40	12' 0-23
DCNB	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	4' 1-10	4' 1-6	3' 1-16	5±2	3±1	7±2

н.о. – активность не определяется при заданных условиях эксперимента;

а - различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Окунеевое;

' - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний.

Успешное выживание и размножение изученных видов рыб в условиях техногенной трансформации оз. Костомукшское свидетельствует о том, что уровень антропогенного воздействия пока не превысил адаптационных возможностей этих организмов и выявленные изменения актив-

ности глутатион S-трансфераз носят компенсаторный характер.

3.2. Выделение GST из печени щуки и изучение свойств очищенного фермента

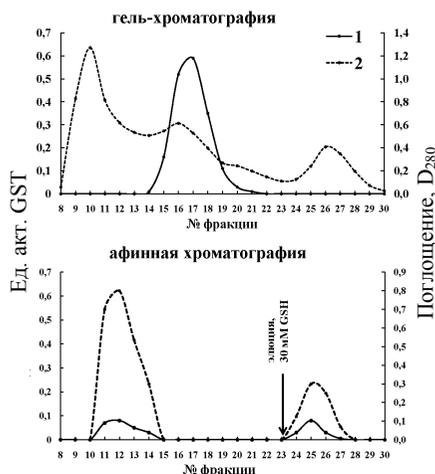


Рис. 3. Элюиционный профиль белка и общей активности GST из печени щук на колонке с Sephadex G-100 и на аффинном носителе GSH-Sepharose:

1 – активность GST; 2 – поглощение белка при 280 нм

3.2.1. Методические особенности получения очищенного фермента

В результате последовательного применения методов гель-хроматографии и аффинной хроматографии из печени щук был получен препарат очищенной GST (EI-GST) (рис. 3). Фермент был очищен примерно в 79 раз, с итоговым выходом около 25%. Количество полученного белка составило 0,4% от растворимого белка цитозоля.

3.2.2. Физические свойства и субъединичный состав

Очищенная GST из печени щуки (EI-GST) имела кажущуюся молекулярную массу 53 ± 3 кДа и состояла из двух субъединиц с массой 29 кДа (рис. 4). Значение изоэлектрической точки очищенной EI-GST соответствует 6,4 ед. (рис. 5).

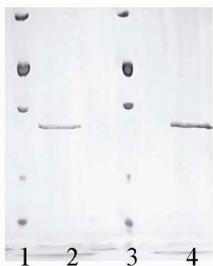


Рис. 4. SDS-электрофорез в ПААГ: 2, 4 – GST из печени щук; 1, 3 – маркеры молекулярного веса (сверху вниз): фосфорилаза b (97 кДа), альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа), б-лактальбумин (14,4 кДа)



Рис. 5. Изоэлектрическое фокусирование в ПААГ: 1, 3 – EI-GST; 2 – маркеры изоэлектрической точки (сверху вниз): фикоцианин (pI 4.65), в-лактоглобулин (pI 5.1), карбоангидраза быка (pI 6.0), карбоангидраза человека (pI 6.5), миоглобин лошади (pI 6.8), гемоглобин А (pI 7.1), гемоглобин С (pI 7.5), цитохром с (pI 9.6)

3.2.3. Влияние pH среды на активность GST

Оптимум pH очищенной E1-GST равен 9.0 (рис. 6), что на 1,5 единицы ближе к диапазону физиологических значений pH по сравнению с оптимумом реакций, протекающей самопроизвольно.

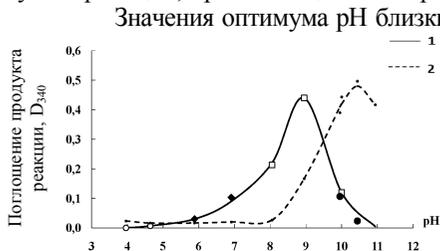


Рис. 6. Влияние pH среды на связывание CDNB с GSH в присутствии очищенной глутатион S-трансферазы (1) и без неё (2):

○ – 0,2М Na-ацетатный буфер; ◆ – 0,2М PBS; □ – 0,2М буфер глицин-NaOH; ● – 0,2М карбонатный буфер

Значения оптимума pH близкие к 9.0 были получены для тропической рыбы *Rivulus marmoratus*, полихеты *Neanthes succinea*, гевеи *Hevea brasiliensis*, а также горошка *Pisum sativum* (Balabaskaran, Muniandy, 1984; Edwards, 1996; Lee et al., 2006; Rhee et al., 2007), для других организмов оптимум pH как правило лежит в диапазоне нейтральных значений.

3.2.4. Влияние температуры на активность GST

E1-GST из печени шуки отличается стабильностью в диапазоне температур, характерных для мест

обитания этого вида: фермент выдерживает нагревание в течение 20 мин при 35°C с потерей 11% активности, тогда как при 45°C потеря активности составляет уже более 80% (рис. 7).

Температурный оптимум активности очищенной GST из печени шуки равен 40°C (рис. 8), то есть соответствует значению характерному для подавляющего большинства ферментов животных (Проскурина, 2004). При этом в диапазоне температур, характерных для мест обитания этого вида, активность может значительно изменяться: так при 10°C активность GST повышается на 25%, а при 20°C на 40%, по сравнению с таковой при 4°C. Таким образом, GST шуки могут принимать участие в процессах адаптации к изменению температуры окружающей среды.

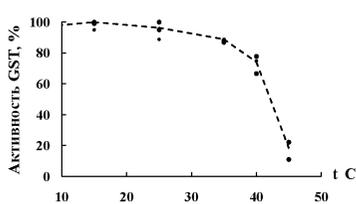


Рис. 7. Термостабильность GST из печени шуки (время инкубации - 20 мин.)

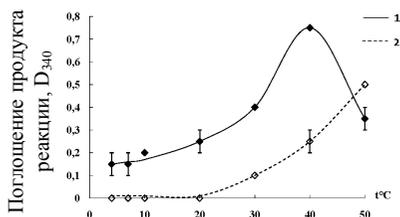


Рис. 8. Влияние температуры на связывание CDNB с GSH в присутствии очищенной глутатион S-трансферазы (1) и без неё (2) 19

3.2.5. Кинетические свойства очищенного фермента

В исследованном диапазоне концентраций субстрата CDNB EI-GST щуки подчиняется кинетике Михаэлиса – Ментен. Для фермента были получены следующие значения кинетических констант: $K_m = 0,75 \pm 0,13$ мМ CDNB, $V_{max} = 12.81 \pm 0.83$ μ М CDNB/мин/мг белка. По этим показателям выделенный фермент ближе всего к AaGST1-1 угря *Anguilla anguilla* и GST T мраморного ривулуса *Rivulus marmoratus*, которые были отнесены к группе GST обозначенных как класс ρ (Lee et al., 2006; Carletti et al., 2008).

Таблица 10

Сравнение специфической активности EI-GST из печени щуки с активностью очищенной GST других видов рыб

класс	субстрат		DCNB	EtA	NNO	tPB	tSO	Литература
	вид							
	EI-GST щуки, <i>Exos. lucius</i>		н.о.	67	41	н.о.	н.о.	наши данные
ρ	pmGSTA1-1 пагра, <i>Pagrus major</i>		н.о.	н.о.	–	–	–	Konishi et al., 2005b
ρ	GST A камбалы, <i>Pleuronectes platessa</i>		0,37	н.о.	–	–	–	George, Buchanan, 1990
	GST B камбалы, <i>Pleuronectes platessa</i>		0,4	0,08	–	0,3	–	George, Buchanan, 1990
ρ	AaGST1-1 угря, <i>Anguilla anguilla</i>		н.о.	1,08	0,31	н.о.	–	Carletti et al., 2008
π	AaGSTP1-1 угря, <i>Anguilla anguilla</i>		н.о.	3,3	0,9	0,1	–	Carletti et al., 2008
ρ	DL-GST-6.7 лаврака, <i>Dicentrarchus labrax</i>		0,1	1	–	–	–	Angelucci et al., 2000
α	DL-GST-8.2 лаврака, <i>Dicentrarchus labrax</i>		0,03	2	–	–	–	Angelucci et al., 2000
	maGST угря <i>Monopterus albus</i>		–	н.о.	–	–	–	Huang e al., 2008
	GST из жабр плотвы, <i>Rutilus rutilus</i>		н.о.	55	–	–	–	Šetlíková, Wiegand, 2009
	GST из печени плотвы, <i>Rutilus rutilus</i>		0,1	35	–	–	–	Šetlíková, Wiegand, 2009
	GST из жабр карпа, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		н.о.	100	–	–	–	Šetlíková, Wiegand, 2009
	GST из печени карпа, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>		0,1	69	–	–	–	Šetlíková, Wiegand, 2009
	GST из печени лосося <i>Salmo salar</i>		4,2	26	–	–	–	Nóvoa-Valiñas et al., 2002
	GST из печени кумжи <i>Salmo trutta</i>		1,7	13,7	–	–	–	Nóvoa-Valiñas et al., 2002

Данные представлены в % относительно общей неспецифической активности в присутствии субстрата CDNB:

н.о. – активность в присутствии данного субстрата ниже границы определения;

– - эксперимент с данным субстратом не проводили.

3.2.6. Субстратная специфичность

Изучение субстратной специфичности очищенной GST выявило способность EI-GST метаболизировать такие субстраты как CDNB, NNO и EtA. По субстратной специфичности GST из печени щуки сходна с GST из печени угря, охарактеризованной как GST ρ класса, однако обладает гораздо большим реакционным потенциалом с субстратами NNO и EtA чем GST угря (таб. 10). Значение активности GST в присутствии NNO составляет 41%, а с EtA 67% от активности с CDNB. Сходные значения активности GST с EtA были получены в жабрах плотвы *R. rutilus* и печени карпа *Hypophthalmichthys molitrix*, а также GST 8-8 (α класс) и GST 7-7 (π класс) крыс (Hays, 1986; Mannervik et al., 1985).

ВЫВОДЫ

1. Активность глутатион S-трансфераз у рыб (щука, сиг и плотва) варьирует в зависимости от вида, ткани и в ряде случаев от пола и возраста. Исследованные глутатион S-трансферазы характеризуются различной субстратной специфичностью, что указывает на присутствие в тканях рыб нескольких изоформ фермента.

2. Глутатион S-трансфераза из печени щуки является типичным представителем семейства глутатион S-трансфераз и представляет собой гомодимер с кажущейся молекулярной массой 53 кДа, массой субъединиц ~29 кДа и значением изоэлектрической точки pI 6.4. Каталитические свойства фермента наиболее близки к таковым у глутатион S-трансфераз класса ρ , π и α .

3. Глутатион S-трансферазы щуки, плотвы и сига участвуют в развитии ответной реакции организма рыб на изменение среды, вызванное техногенной трансформацией водоема. Характер изменений активности GST специфичен для каждого из исследованных видов. Применение серии специфических субстратов при определении активности глутатион S-трансфераз позволяет с большей долей вероятности выявить ответную реакцию, чем при использовании только универсального субстрата - 1-хлор-2,4-динитробензола.

4. Поскольку активность тканевых глутатион S-трансфераз является одним из показателей адаптивных возможностей организма, она в комплексе с другими биомаркерами может быть использована для эколого-биохимического мониторинга состояния рыб в водоемах, подвергшихся техногенному воздействию.

Список используемых сокращений:

GST - глутатион S-трансфераза

EI-GST – очищенная глутатион S-трансфераза из печени щуки

ГОК - горно-обогатительный комбинат

ПДК - предельно допустимые концентрации
CDNB - 1-хлор-2,4-динитробензол
DCNB - 1,2-дихлор-4-нитробензол
EtA - этакриновая кислота
NNO - 4-нитрохинолин N-оксид
tPB - транс-4-фенил-3-бутен-2-оном
tSO - транс-стильбен оксидом
Km - константа Михаэлиса
Vmax - максимальная скорость реакции

Список работ опубликованных по теме диссертации:

Статьи в журналах рекомендованных ВАК:

1. Борвинская Е.В., Немова Н.Н., Смирнов Л.П. Глутатион-S-трансфераза у рыб северных водоемов: влияние минерализации водной среды // Доклады Академии Наук РАН. Серия Биология. 2011. Т. 436. № 4. С. 566-568.
2. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Суховская И.В., Немова Н.Н. Влияние минерализации на активность глутатион S-трансферазы у некоторых видов пресноводных рыб северных водоемов // Труды Карельского Научного Центра РАН. 2011. № 3. С. 16-20.
3. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П. Некоторые методические особенности определения активности глутатион S-трансферазы в тканях рыб // Ученые записки ПетрГУ. 2010. №6. С. 19-21.

Публикации в российских и зарубежных сборниках статей и материалах конференций:

4. Суховская И.В. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200-220 нм и по Бредфорд // Труды Карельского Научного Центра РАН. 2010. № 2. С. 68-71.
5. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Глутатион-S-трансферазы рыб - потенциальные эколого-биохимические индикаторы антропогенного воздействия на водную среду // Труды Карельского Научного Центра РАН. 2009. № 3. С. 8-20.
6. Борвинская Е.В., Суховская И.В., Смирнов Л.П. К вопросу об использовании активности глутатион-S-трансферазы у рыб в качестве эколого-биохимического индикатора // Актуальные проблемы биологии и экологии: материалы XVI Всероссийской молодежной науч. конф. Сыктывкар, 2009. С. 36-37.
7. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Суховская И.В. Глутатион-S-трансфераза в тканях сегов из Тумасозера // Сохранение биологического разнообразия наземных и морских экосистем в условиях высоких широт: материалы Межд. науч. практич. конф. Мурманск, 2009. С. 17-20.
8. Borvinskaya E.V., Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P. Mercury effect on thiol-containing low molecular weight peptides of rat tissues // 17th International Environmental Bioindicators Conference. Moscow, 2009. Abstracts. P.15.
9. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Суховская И.В. Тканеспецифические осо-

бенности активности глутатион-S-трансферазы у сига // Биологические ресурсы Белого моря и внутр. водоемов европейского Севера: материалы XXVIII Межд. конф. Петрозаводск, 2009. С. 99-101.

10. Borvinskaya E.V., Smirnov L.P., Nemova N.N., Sukhovskaya I.V. A comparative study of glutathione transferase activity in whitefish (*Coregonus lavaretus*) from basins with different pollution levels // Water Observation and Information System for Decision Support: Fourth International Conference on "BALWOIS 2010". Ohrid, 2010. Abstracts. V 1. P. 439.

11. Борвинская Е.В., Суховская И.В., Смирнов Л.П. Влияние минерального загрязнения на активность глутатион S-трансферазы у рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы III Межд. конф. Петрозаводск, 2010. Т 1. С. 12-14.

12. Borvinskaya E.V., Smirnov L.P., Sukhovskaya I.V. Glutathione S-transferase activity from the northern fresh-water fish under mineral contamination // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы Третьей межд. конф. Петрозаводск. 2010. Т 2. С. 16-18.

13. Борвинская Е.В., Суховская И.В., Смирнов Л.П. Глутатион S-трансферазы у некоторых видов рыб из водоемов с разным уровнем загрязнения // Природа морской Арктики: современные вызовы и роль науки: Межд. науч. конф. Мурманск, 2010. С. 35-36.

14. Борвинская Е.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Характеристика глутатион S-трансферазы печени шук // Белки и пептиды: тезисы докладов V Российского симпозиума. Петрозаводск. 2011. С. 269.

15. Борвинская Е.В., Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Влияние техногенного загрязнения на детоксикационную систему рыб Костомукшского хвостохранилища // Современное состояние биоресурсов внутренних водоемов: сб. науч. тр. Всерос. конф. с межд. участием. Борок, 2011. С. 69-73.

Формат 60x84 ¹/₁₆ Бумага офсетная. Гарнитура «Times».
Уч.-изд. л. 1,2. Усл. печ. л. 1,3. Подписано в печать 09.02.12.
Тираж 100 экз. Изд. № 273. Заказ № 26.

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