

УДК [577.121.7+577.151]:597.552.51

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СИГОВ *COREGONUS LAVARETUS* L., ОБИТАЮЩИХ В ХВОСТОХРАНИЛИЩЕ ГОРНООБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА, ПО НЕКОТОРЫМ БИОХИМИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

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

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Проведено сравнительное исследование уровня РНК/ДНК, активности ферментов энергетического и углеводного обмена, уровня экспрессии генов некоторых ферментов в мышцах, печени, почках и жабрах сигов (3+ и 4+), обитающих в чистом озере (оз. Каменное) и хвостохранилище отходов Костомукшского горнообогатительного комбината (оз. Костомукшское). Показано, что значение индекса РНК/ДНК в белых мышцах сигов из загрязненного озера было значительно ниже, чем в мышцах сигов из чистого озера, что указывает на более низкий уровень синтеза белка и замедление темпов роста рыб из хвостохранилища. Энергетический обмен мышц, печени сигов из неблагоприятного водоема характеризовался низким уровнем аэробного синтеза АТФ и более высоким уровнем анаэробного обмена, что, возможно, является компенсаторным механизмом поддержания энергетического гомеостаза. В жабрах рыб, наоборот, наблюдалась интенсификация аэробного обмена. Особенностью метаболизма печени являлось также усиленное использование углеводов в процессах энергообеспечения и в пентозофосфатном пути. Установлены различия в уровне экспрессии генов цитохром с оксидазы и лактатдегидрогеназы в белых мышцах сигов 3+ и 4+ из чистого и техногенного водоемов, отражающие возрастные особенности в регуляции активности ферментов ЦО и ЛДГ на уровне транскрипции при адаптации к неблагоприятному воздействию.

Ключевые слова: ферменты энергетического и углеводного обмена, индекс РНК/ДНК, экспрессия генов, техногенный водоем, сиги.

M. V. Churova, O. V. Mesheryakova, N. V. Ilmast, N. N. Nemova. HEALTH ASSESSMENT OF WHITEFISH *COREGONUS LAVARETUS* L. FROM THE TAILING DUMP OF THE KOSTOMUKSHA IRON MINING AND ORE DRESSING MILL BY SEVERAL BIOCHEMICAL MARKERS AND LEVEL OF ENZYME GENE EXPRESSION

The comparative study of RNA/DNA ratio, enzymes activity of energy and carbohydrate metabolism, enzymes gene expression in muscles, liver, kidney and gills of whitefish inhabiting the tailing dump of the Kostomuksha iron mining and ore dressing mill (lake Kostomukshskoe) and non affected lake Kamennoe were examined. The RNA/DNA ratio in white muscles of whitefish from the tailing dump was lower in comparison with whitefish from lake Kamennoe, that indicates the lower growth rate of fish from the tailing dump. Energy metabolism of muscles and liver of whitefish from affected lake is characterized by the low level of aerobic ATP synthesis and the high level of anaerobic

metabolism. The aerobic metabolism in gills of whitefish from the tailing dump was intensified. The using of carbohydrates in energy metabolism and in pentose-phosphate pathway were intensified in liver of affected lake fish. The difference in expression level of genes of lactate dehydrogenase and cytochrome c oxidase in muscles of different ages whitefish from clean and antropogenically affected water bodies were established. It reflected the age-dependent alterations in transcriptional regulation of cytochrome c oxidase and lactate dehydrogenase during adaptation to unfavorable environmental conditions.

Key words: enzymes of energy and carbohydrate metabolism, RNA/DNA ratio, gene expression, industrial waters, whitefish.

Введение

Важной составляющей в оценке состояния, роста и развития рыб при изменении условий окружающей среды является исследование их биохимических и молекулярно-генетических параметров. Изменения на клеточном и молекулярном уровне, возникающие в организме рыб, происходят на самых ранних этапах негативного воздействия, задолго до того, как проявятся изменения на физиологическом, организменном и популяционном уровне [Немова, Высоцкая, 2004; Konradt, Braunbeck, 2001]. В экотоксикологических исследованиях для оценки состояния рыб, темпов их роста, функциональной и метаболической активности органов и тканей используют различные биохимические показатели, в частности определение индекса отношения концентрации нуклеиновых кислот (РНК/ДНК), активности ферментов общих путей метаболизма, а также уровень экспрессии ряда генов, кодирующих ферменты или другие белки. Например, достаточно чувствительным к различным видам загрязнения водных экосистем является индекс соотношения концентраций нуклеиновых кислот РНК/ДНК [Grant, 1996; Mankiewicz-Boczek et al., 2010], отражающий уровень синтеза белков, в том числе обеспечивающих прирост мышечной ткани рыб. Он показывает, как меняется уровень клеточной РНК и соответственно синтез белка при постоянной концентрации ДНК в клетке. В связи с этим данный параметр используется для оценки состояния и темпов роста рыб.

Активность ключевых ферментов энергетического обмена и метаболизма углеводов у рыб при воздействии различных факторов среды позволяет оценить интенсивность и направление путей аэробного и анаэробного синтеза АТФ, степень использования углеводов в энергетическом и пластическом обмене, выявить закономерности и механизмы поддержания необходимого уровня метаболического гомеостаза при неблагоприятном воздействии [Ме-

щерякова и др., 2004; Немова, 2005; Konradt, Braunbeck, 2001]. Так, показателем уровня аэробного обмена служит активность фермента дыхательной цепи митохондрий цитохром с оксидазы [Goolish, Adelman, 1987], характеризующий степень окисления всех энергетических субстратов – промежуточных продуктов распада углеводов, белков и жиров – в процессе аэробного метаболизма и сопряженного с ним аэробного синтеза АТФ. Малатдегидрогеназа – фермент цикла трикарбоновых кислот – при наличии корреляции с ЦО также отражает уровень аэробного метаболизма [Merrit, Quattro, 2003]. Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию взаимного превращения лактата в пируват. В зависимости от направления реакции, катализируемого различными изоферментами, активность фермента служит показателем интенсивности анаэробного метаболизма (преимущественно в мышцах), индикатором глюконеогенеза – процесса ресинтеза глюкозы в печени или превращения лактата в пируват с последующим его включением в аэробный метаболизм. Значение активности определяемой в данной работе изоформы альдолазы характеризует уровень окисления углеводов в гликолизе. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы указывает на интенсивность протекания пентозофосфатного пути окисления углеводов, в процессе которого образуются пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, а также НАДФН для реакций биосинтеза липидов и восстановления глутатиона [Konradt, Braunbeck, 2001].

Для оценки воздействия промышленного производства на рыб и выявления возможных механизмов их адаптации проведено сравнительное исследование показателя РНК/ДНК, активности ферментов энергетического и углеводного обмена и уровня экспрессии генов некоторых ферментов в мышцах, печени, почках и жабрах сига *Coregonus Lavaretus* L., обитающих в чистом озере (оз. Каменное) и хвостохранилище отходов Костомукшского горнообогатительного комбината (оз. Костомукшское).

Материал и методы

Исследовали сигов двух возрастных групп 3+, 4+, выловленных в озерах Костомукшское и Каменное в июне 2009 г. Озеро Костомукшское (54°61' с.ш., 30°47' в.д.) в результате строительства дамбы преобразовано в технологический водоем Костомукшского горно-обогатительного комбината и используется для оборотного водоснабжения и захоронения отходов производства (хвостов обогащения, которые в виде пульпы поступают в водоем). Вода в озере характеризуется высоким содержанием ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , высокой минерализацией (до 645 г/мл), большим количеством мелкодисперсной минеральной взвеси (1,34 мг/л) [Состояние водных объектов ..., 2007; Ильмаст и др., 2010]. Озеро Каменное (64°28' с.ш., 30°13' в.д.) представляет собой чистый водоем с аналогичным температурным режимом и глубиной. Размерно-весовые характеристики рыб представлены в табл. 1.

Определение активности ферментов. Активность ферментов определяли в белых мышцах, печени, жабрах и почках сигов. Ткань гомогенизировали в 0,01 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,5). Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, 1.1.1.49), малатдегидрогеназы (МДГ, 1.1.1.37) в органах сигов определяли по общепринятым методикам [Кочетов, 1980]. Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) – по методике Векс в модификации Ананьева и Обуховой [Колб, Камышников, 1976]. Активность цитохром с оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита [Smith, 1955], при этом цитохром с восстанавливали двукратным по массе количеством аскорбиновой кислоты в 0,02 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0) в течение 2 ч и затем на колонке с сефадексом G-25 выделяли в восстановленной форме свободным от избытка восстановителя.

Определение концентрации РНК и ДНК. Тотальную РНК выделяли из белых мышц по Хомчински и Сакхи (Chomczynski, Sacchi, 1987) с помощью набора Yellow Solve («Клоноген», С.-Петербург). ДНК белых мышц экстрагировали методом Альанаби и Мартинеса [Aljanabi, Martinez, 1997]. Концентрации РНК и ДНК определяли спектрофотометрически (спектро-

фотометр SmartSpec Plus, BioRad, США) [Маниатис и др., 1984].

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов цитохром с оксидазы субъединицы IV (COX IV) и лактатдегидрогеназы субъединицы А (LDH-A) в белых мышцах оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед./мл) («Силекс», Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексануклеотидов (набор «Синтез первой цепи ДНК», «Силекс»). Концентрацию кДНК измеряли спектрофотометрически. Амплификацию осуществляли на приборе i-Cycler с оптической приставкой IQ5 (BioRad) с использованием набора «2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами в присутствии SYBR Green I» («Синтол», Россия). Праймеры подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.0. Последовательности праймеров следующие:

LDH-A: прямой 5'-CGTTGACATCCTGACCTAC-3',
обратный 5'-TCTCCGTGCTCTCCAATG-3'
(GenBank BT043598);

COX IV: прямой 5'-TACGTGGGGCACATGGTGT-3',
обратный 5'-CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC-3'
(GenBank BT043749);

фактор элонгации *EF-1* (GenBank AF321836)

прямой 5'-TGCTGGTGGTGTGGTGAG-3',
обратный 5'-AAACGCTTCTGGCTGTAGGG-3'.

Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95°C 5 мин; повторяющиеся циклы (45): денатурация ДНК при 95°C 20 с, отжиг праймеров при 59°C по 30 с, элонгация ДНК при 72°C по 30 с; с последующей процедурой плавления фрагментов ДНК. Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой [Gahr et al., 2008]. Уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *EF-1*. Данные выражались как отношение концентрации мРНК исследуемого гена к концентрации мРНК *EF-1*.

Математический анализ полученных результатов производили с помощью непараметрических критериев: Манна-Уитни и рангового коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [Коросов, Горбач, 2007].

Таблица 1. Линейно-весовые характеристики сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское

Показатель	3+		4+	
	оз. Каменное (n=9)	оз. Костомукшское (n=7)	оз. Каменное (n=5)	оз. Костомукшское (n=5)
Длина (см)	20,50 ± 0,29	18,70 ± 0,35*	25,13 ± 0,77	21,6 ± 0,15*
Вес (г)	84,7 ± 3,49	65 ± 4,18*	142,83 ± 1,48	101,33 ± 5,49*

* Достоверность различий между озерами при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Показатель РНК/ДНК в белых мышцах сигов из сравниваемых озер

Согласно результатам исследования, значение показателя РНК/ДНК в белых мышцах сигов обоих возрастов, обитающих в хвостохранилище, было ниже по сравнению с таковым в мышцах рыб из чистого водоема (рис. 1). Это указывает на снижение уровня синтеза белков, в том числе обеспечивающих прирост мышечной массы рыб, ухудшение состояния рыб и снижение темпов их роста. Эти выводы подтверждаются и данными по линейно-весовым характеристикам рыб, свидетельствующими о меньших размерах сигов из неблагоприятного водоема (см. табл. 1). Мы предполагаем, что низкий уровень синтеза белка у рыб из

техногенного водоема и снижение темпов их роста обусловлены следующими факторами: во-первых, скудной кормовой базой этого озера (по данным ихтиологического анализа [Ильмаст и др., 2010]) и, во-вторых, неблагоприятным влиянием компонентов воды на различные метаболические процессы рыб, определяющие интенсивность белкового синтеза. Результаты наших исследований хорошо согласуются с литературными сведениями. Так, например, снижение индекса РНК/ДНК и темпов роста рыб было показано для окуней *Perca fluviatilis* L., испытывающих влияние сточных вод [Mankiewicz-Boczek et al., 2010], *P. flavescens*, обитающих в озере с высоким содержанием тяжелых металлов [Audet, Couture, 2003], а также при действии токсических веществ на рыб разных видов в экспериментальных условиях [Mohapatra, Noble, 1992; Varo et al., 2007].

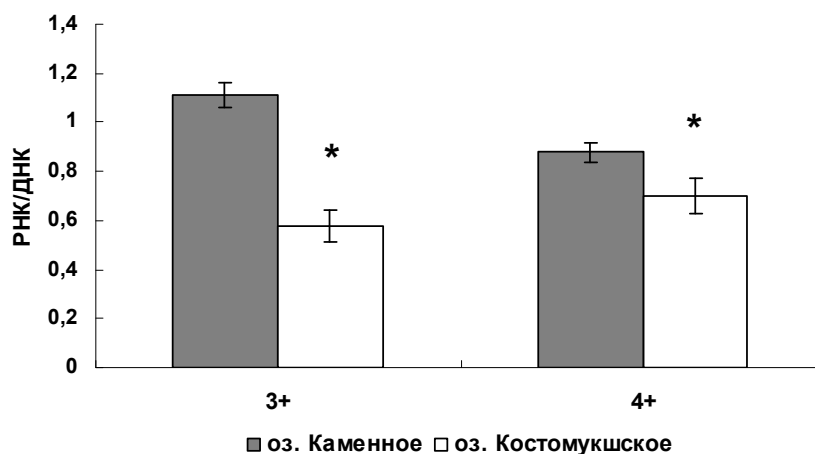


Рис. 1. Значение показателя РНК/ДНК в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское ($M \pm m$)

Активность ферментов в различных органах сигов из сравниваемых озер. Тканеспецифичные особенности

В белых мышцах сигов из хвостохранилища отмечался низкий уровень аэробного энергетического обмена и высокий – анаэробного процесса синтеза АТФ, на что указывала более низкая активность цитохром с оксидазы и высокая – ЛДГ по сравнению с сигами из оз. Каменное (табл. 2). Интенсификацию анаэробного синтеза АТФ можно рассматривать как компенсаторную реакцию энергетического метаболизма, направленную на частичное восполнение недостающего количества АТФ, получаемое аэробным путем [Richards, 2009]. Кроме того, у сигов из сравниваемых озер наблюдалось различное значение коэффициента корреляции активностей аэробных и анаэробных ферментов: у сигов из чистого озера оно было положительным, а у рыб из хвостохранилища – отрицательным (табл. 3). Это

свидетельствовало о том, что в норме аэробный и анаэробный пути синтеза АТФ функционируют совокупно, а при неблагоприятном влиянии на организм снижение интенсивности аэробного метаболизма компенсируется увеличением уровня анаэробного.

Особенность метаболизма белых мышц сигов из хвостохранилища состояла также в перераспределении использования углеводов между аэробным и анаэробным энергетическим метаболизмом в сторону усиления их использования в анаэробном синтезе АТФ. На это указывали более низкое значение активности альдолазы в мышцах (см. табл. 2) и отличия во взаимосвязи активности альдолазы и ферментов аэробного и анаэробного обмена (см. табл. 3). Значения коэффициентов корреляции альдолазы с ЦО и ЛДГ в мышцах сигов из чистого водоема были положительными и высокими, а для сигов из техногенного озера наблюдалась достоверная взаимосвязь только для альдолазы и ЛДГ.

Таблица 2. Удельная активность ферментов в органах сигов возрастом 3+ и 4+, обитающих в озерах Каменное и Костомукшское

Фермент	3+			4+		
	оз. Каменное	оз. Костомукшское	М, %	оз. Каменное	оз. Костомукшское	М, %
Мышцы						
ЦО	1,25±0,08	0,96±0,09*	23	1,78±0,32	0,79±0,25*	56
МДГ	15,03±0,99	13,05±1,12		16,38±1,83	14,30±1,61	
ЛДГ	328,127±15,59	400,96 ± 17,68*	22	252,01±18,5	362,16±16,6*	40
альдолаза	100,03±2,82	87,28 ± 3,01*	12	93,57±6,62	86,05±4,04	
Печень						
ЦО	2,38±0,14	1,14±0,16*	52	2,83 ± 0,15	1,82 ± 0,11*	35
МДГ	3,25±0,64	1,29±0,22*	60	4,33 ± 1,1	1,66 ± 0,6*	62
ЛДГ	201,44±19,66	290,82 ± 23,22*	44	181,68 ± 15,51	259,43 ± 19,66*	43
альдолаза	42,09±2,94	56,88 ± 5,44*	35	52,65 ± 2,13	58,61 ± 4,15*	11
Г-6-ФДГ	4,74±0,56	8,16 ± 1,59*	72	10,09 ± 0,3	16,51 ± 1,23*	64
Почки						
ЦО	5,38±0,37	2,20±0,44*	59	5,71±0,40	3,52±0,36	38
МДГ	19,11±1,26	9,15±0,9*	52	20,35 ± 1,2	10,37 ± 0,9	49
Г-6-ФДГ	4,63±1,1	1,77±0,45*	62	4,64±0,9	1,55±0,35*	67
ЛДГ	93,3±17,3	65,36±11,5*	30	80,93 ± 10,72	64,11 ± 9,98*	21
альдолаза	29±2,05	13,57±1,98*	53	20,71 ± 1,86	12,31 ± 1,56*	41
Жабры						
ЦО	1,51±0,26	4,35±1,05*	188	2,88 ± 0,34	5,17 ± 0,88*	80
ЛДГ	81,81±5,59	47,56±6,93*	42	111,98 ± 6,70*	75,91 ± 5,35*	32
альдолаза	21,95±7,28	22,35±8,16		11,97 ± 5,11	10,75 ± 2,35	

Примечания. * Достоверные различия между активностью ферментов сигов одного возраста из разных озер ($P < 0,05$). Значение удельной активности ферментов представлено как $M \pm m$ в следующих единицах измерения: для ЦО – к / мг белка, для остальных ферментов – мкмоль/ мин/ мг белка.

Таблица 3. Значение коэффициентов корреляции активности исследуемых ферментов между собой в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из сравниваемых озер

Фермент	3+		4+	
	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское
г (ЛДГ)				
ЦО	0,82*	0,71*	0,92*	0,86*
г (альдолаза)				
ЦО	0,88*	0,23	0,89*	0,3
ЛДГ	0,84*	0,76*	0,93*	0,83*

* Достоверные значения коэффициента корреляции ($P < 0,05$).

В печени сигов из хвостохранилища был отмечен низкий уровень аэробного синтеза АТФ, о чем свидетельствовала низкая активность ферментов аэробного обмена ЦО и МДГ (см. табл. 2). Как известно, аэробный метаболизм имеет огромное значение для клеток печени. Это полифункциональный орган, здесь пересекаются метаболические пути углеводного, липидного и белкового обмена, синтезируются различные соединения для пластического обмена, осуществляются процессы детоксикации. Для выполнения такого большого числа функций необходим достаточный уровень АТФ, поэтому энергообеспечение клеток печени осуществляется главным образом за счет эффективного аэробного синтеза АТФ. В норме клетки печени содержат большое количество митохондрий, имеют высокую активность митохондриальных ферментов, в том числе ЦО и МДГ [Романенко, 1978; Goolish, Adelman, 1987]. Даже незначительное уменьшение интенсивности аэробного энергообеспечения клеток печени приводит к нарушению

многих процессов их жизнедеятельности и снижению функциональной активности органа, что отрицательно сказывается на жизнедеятельности всего организма рыб, темпах его роста и способности адаптироваться к изменению условий окружающей среды.

Несмотря на более скудную и обедненную кормовую базу оз. Костомукшское по сравнению с кормовой базой оз. Каменное [Ильмаст и др., 2010], согласно данным гистологического анализа [Мурзина и др., 2011], в печени сигов из хвостохранилища наблюдалось жировое перерождение. Мы предполагаем, что это связано с низким уровнем аэробного окислительного метаболизма, так как невозможность полного окисления питательных веществ, поступающих с пищей, приводит к их накоплению и запасанию в виде липидов. Следует подчеркнуть, что важнейшим преимуществом аэробного метаболизма является возможность использования в нем различных энергетических субстратов – промежуточных продуктов распада белков, липидов, углеводов, что имеет огром-

ное значение при несбалансированном питании и приспособлении к условиям окружающей среды. Таким образом, низкий уровень аэробного синтеза АТФ в печени сигов из хвостохранилища делает невозможным достаточно эффективное и полноценное использование даже относительно небольшого количества поступающих с пищей веществ и приводит, с одной стороны, к дефициту энергии, а с другой – к избыточному накоплению липидов в печени.

Обменные процессы в печени сигов из неблагоприятного озера характеризовались также интенсивным метаболизмом углеводов, активным использованием их в энергетическом и пластическом обмене. Так, например, высокие значения активности альдолазы и ЛДГ по сравнению с таковыми в печени сигов из чистого озера (см. табл. 2) свидетельствовали об усилении их использования в процессах анаэробного энергообеспечения, а высокая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы указывала на более высокий уровень пентозо-фосфатного пути окисления углеводов (см. табл. 2). Повышение активности Г-6-ФДГ печени рыб при токсическом воздействии на рыб отмечается во многих исследованиях [Konradt, Braunbeck, 2001; Venkataramana, Radhakrishnaiah, 2001]. Вероятно, высокие значения активности фермента связаны с увеличением потребности в эквивалентах НАДФН для восстановления глутатиона, участвующего в процессах детоксикации ксенобиотиков. Эти результаты согласуются с исследованием наших коллег, отмечавших высокую активность глутатион S-трансферазы, фермента системы биотрансформации ксенобиотиков, в печени сигов из хвостохранилища [Борвинская и др., 2011]. Сходные результаты по положительной зависимости активностей ферментов Г6ФДГ и глутатион S-трансферазы отмечены и для других видов рыб, в частности для карпа *Cyprinus Carpio*, обитающего в условиях антропогенного загрязнения вод [Sahan et al., 2010].

В почках сигов из хвостохранилища активность всех исследуемых ферментов была ниже, чем в почках сигов из чистого водоема (см. табл. 2), что говорит о снижении в них энергетического обмена (как аэробного, так и анаэробного процессов синтеза АТФ), степени использования углеводов в энергетическом и пластическом обмене. В данном случае, возможно, имеет место серьезное нарушение метаболической и функциональной активности почек, что может быть вызвано сильным влиянием высокого уровня минерализации воды в хвостохранилище.

В жабрах сигов из хвостохранилища активность лактатдегидрогеназы была ниже, а цитохром с оксидазы выше по сравнению с рыбами

из оз. Каменное (см. табл. 2). Так как активность альдолазы практически не изменялась, а ЛДГ снижалась (см. табл. 2), это указывало на то, что уровень использования углеводов в энергообмене жабр сига не изменялся, а происходило перераспределение степени использования углеводов между аэробным и анаэробным метаболизмом в сторону усиления аэробного синтеза АТФ. Это свидетельствует об интенсификации процесса аэробного энергетического обмена, направленной на усиление функционирования жаберного аппарата и повышение эффективности дыхания в данных неблагоприятных условиях [Gagnon, Holdway, 1999; Немова, 2005].

Таким образом, в органах сигов из техногенного водоема наблюдались серьезные различия в протекании ряда метаболических путей, однако значительных возрастных особенностей при этом не отмечено. Прежде всего, обращает на себя внимание снижение уровня одного из важнейших процессов – аэробного синтеза АТФ в мышцах, печени и почках рыб. Можно предположить, что сиги, обитающие в хвостохранилище, испытывают состояние гипоксии. Это может быть связано с низким уровнем поступления кислорода в организм рыб в результате нарушения функционирования клеток жаберного аппарата под прямым воздействием минеральных компонентов воды или оседания мелкодисперсной механической взвеси на жабрах, блокирующей поступление кислорода. Аэробный обмен служит основным источником энергии, высокий уровень которого отражается на проявлении активной жизнедеятельности организма, процессах роста и развития [Озернюк, 2000]. В связи с этим наблюдаемое снижение темпов роста сигов из хвостохранилища можно объяснить не только скудной кормовой базой, но и снижением общего уровня аэробного метаболизма и перераспределением использования углеводов в сторону ряда метаболических процессов, а именно на компенсаторные реакции анаэробного синтеза АТФ и пластический обмен.

Уровень экспрессии генов цитохром с оксидазы и лактатдегидрогеназы-A в белых мышцах сигов из сравниваемых озер

При сравнении уровня экспрессии генов цитохромоксидазы (*COX IV*) и лактатдегидрогеназы-A (*LDH-A*) в белых мышцах сигов из чистого озера и хвостохранилища были обнаружены некоторые возрастные особенности. Так, у сигов из оз. Костомукшское в возрасте 3+ по сравнению с контролем уровень экспрессии гена *COX IV* был существенно выше, а в возрасте 4+ изменение не наблюдалось (рис. 2). Как

известно, молекула цитохром с оксидазы состоит из 13 субъединиц: 3 основных каталитических (*COX I, II, III*), кодируемых митохондриальным геномом, и 10 минорных, которые кодируются ядерным геномом. Субъединица IV цитохром с оксидазы (ядерная) необходима для сборки структуры и аллостерической регуляции активности фермента [Duggan, 2010]. Согласно результатам у сигов 3+ при низкой активности ЦО в мышцах усиливается экспрессия генов. Можно предположить, что у сигов, испытывающих негативное влияние, по сравнению с рыбами из чистого оз. Каменное изменяется баланс процессов синтеза и распада белка в мышцах и требуется дополнительный синтез фермента. Возможно, имеет место прямое влияние компонентов воды на структуру фермента. У сигов 4+ данный эффект был вы-

ражен слабее: по сравнению с сигами из чистого водоема активность ЦО ниже, а уровень экспрессии гена *COX IV* не изменялся.

Что касается уровня экспрессии гена лактатдегидрогеназы анаэробной субъединицы A, то у сигов из оз. Костомукшское в возрасте 4+ он был значительно выше по сравнению с контролем (см. рис. 2). Возможно, что у сигов в возрасте 3+ наблюдаемое увеличение в активности ферментов обеспечивается механизмами регуляции на пост-транскрипционном уровне, тогда как у сигов 4+ также усиливается дополнительный синтез фермента (его анаэробной изоформы). Таким образом, наши результаты свидетельствуют о различиях в механизмах регуляции активности ферментов цитохром с оксидазы и лактатдегидрогеназы у разных возрастных групп сигов из хвостохранилища.

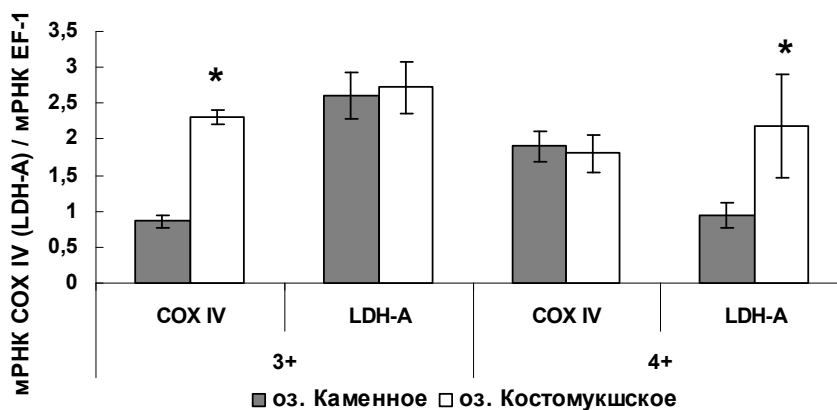


Рис. 2. Уровень экспрессии генов цитохромоксидазы (*COX IV*) и лактатдегидрогеназы – A₄ (*LDH-A*) в белых мышцах сигов возрастом 3+ и 4+ из озер Каменное и Костомукшское ($M \pm m$)

Выводы

1. Показано, что значение индекса РНК/ДНК в белых мышцах у сигов из хвостохранилища ниже, чем у рыб из чистого озера, что указывает на низкий уровень синтеза белка в белых мышцах и снижение темпов роста рыб при неблагоприятном воздействии.

2. Установлено, что характерной реакцией обмена веществ ряда мышц, печени и почек рыб, обитающих в хвостохранилище, является снижение уровня их энергообеспечения, в частности уровня аэробного синтеза АТФ. При этом в мышцах и печени наблюдалась интенсификация процесса анаэробного синтеза АТФ, что являлось компенсаторным механизмом, направленным на частичное поддержание энергетического гомеостаза клеток этих органов.

3. Метаболизм печени сигов из неблагоприятного оз. Костомукшское характеризовался также интенсивным обменом углеводов, а

именно усилением их использования в анаэробном процессе образования энергии и пентозофосфатном пути.

4. Установлен высокий уровень экспрессии генов *COX IV* у сигов 3+ и *LDH-A* у сигов 4+, что указывает на возрастные различия в механизмах регуляции активности ферментов цитохром с оксидазы и лактатдегидрогеназы у разных возрастных групп сигов из хвостохранилища.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг., гранта Президента РФ НШ-3731.2010.4, РФФИ № 11-04-00167_а, проекта программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (№ г.к. 02.740.11.0700, № г.к. 14.740.11.1034, проект НК-28 (12).

Литература

- Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Смирнов Л. П. Глутатион-S-трансфераза у рыб северных водоемов: влияние минерализации водной среды // Доклады Академии наук. 2011. Т. 436, № 4. С. 566–568.
- Ильмаст Н. В., Стерлигова О. П., Кучко Я. А. Биология сига костомукшского хвостохранилища (Республика Карелия) // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: мат. III Всерос. конф. с междунар. участием. Ч. I (Апатиты 4–8 октября, 2010 г.). Апатиты, 2010. 228 с.
- Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия. Минск, 1976. 311 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, 2007. 76 с.
- Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
- Мещерякова О. В., Груздев А. И., Немова Н. Н. Сравнительная энзиматическая оценка углеводного обмена окуней *Perca fluviatilis* L. из водоемов с различным уровнем содержания гуминовых кислот // Известия РАН. Сер. биологическая. 2004. № 1. С. 21–26.
- Моисеенко Т. И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука. 2009. 400 с.
- Мурзина С. А., Нефедова З.А., Немова Н.Н. Использование гистологических методов анализа печени рыб для оценки влияния техногенных вод горнообогатительного комбината (ГОКа) // J. Internat. Scient. Publication: Ecology and safety. 2011. Vol. 4. Part 2. (в печати).
- Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 157 с.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.
- Озернюк Н. Д. Биоэнергетика онтогенеза. М.: изд-во МГУ, 2000. 259 с.
- Романенко В. Д. Печень и регуляция промежуточного обмена. Киев: Наукова думка, 1978. 184 с.
- Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 210 с.
- Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acid Res. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693.
- Audet D., Couture P. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2003. Vol. 60. P. 269–278.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. Vol. 162. P. 156–159.
- Duggan A. Control of cytochrome c oxidase biosynthesis in the thermal remodeling of white muscle of two cyprinid minnows. M.S. thesis. Kingston: Ontario, 2010.
- Gagnon D. F., Holdway A. I. Respiratory functional activity of gills of some fish species at toxic effect // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem Mol. Biol. 1999. Vol. 120. P. 256–266.
- Gahr S. A., Vallejo R. L., Weber G. M. et al. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Physiol. Genomics. 2008. Vol. 32. P. 380–392.
- Goolish E. M., Adelman I. R. Tissue specific cytochrome c oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // Physiol. Zoology. 1987. Vol. 60. P. 454–464.
- Grant G. C. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult brown trout // J. Fish Biol. 1996. N 48. P. 1223–1230.
- Konradt J., Braunbeck T. Alterations of selected metabolic enzymes in sh following long-term exposure to contaminated streams // J. Aquatic Ecosyst. Stress and Recov. 2001. Vol. 8. P. 299–318.
- Mankiewicz-Boczek J., Kaczkowski Z., Godowska M., Zalewski M. RNA/DNA ratio as an indicator of the impact of long-term accumulative contamination for the assessment of river degradation – a pilot study // Ecohydrol. and Hydrobiol. 2010. P I–VIII. URL: <http://versita.metapress.com/content/c906680500771684/> (дата обращения: 15.03.2011).
- Merrit T. J. S., Quattro J. M. Evolution of the vertebrate cytosolic malate dehydrogenase gene family: duplication and divergence in actinopterygian fish // J. Mol. Evol. 2003. Vol. 56. P. 265–276.
- Mohapatra B. C., Noble A. RNA-DNA ratio as indicator of stress in fish // Comp. Physiol. Ecol. 1992. Vol. 17. P. 41–47.
- Richards J. G. Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia // Fish Physiol. Vol. 27. Hypoxia / Eds.: Richards J.G., Farrell A.P., Brauner C.J. San Diego: Elsevier, 2009. P. 443–485.
- Sahan A., Kurutas E. B., Altun T. The determination of biochemical indicators (biomarkers) in the common carp (*Cyprinus carpio*) to the physicochemical parameters of the Ceyhan River (Adana-Turkey) // Ekoloji. 2010. Vol. 19. P. 8–14.
- Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // Methods Biochem. Analysis. 1955. Vol. 2. P. 427–434.
- Varo I., Nunes B., Amat F. et al. Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings // Aquat. Living Resour. 2007. Vol. 20. P. 263–270.
- Venkataramana P., Radhakrishnaiah K. Copper-influenced changes in lactate dehydrogenase and G-6-PDH activities of the freshwater teleost, *Labeo rohita* // Bul. Environ Contam. Toxicol. 2001. Vol. 67. P. 257–263.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Чурова Мария Викторовна

младший научный сотрудник
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: mchurova@yandex.ru
тел. (8142) 571879

Мещерякова Ольга Владимировна

старший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: mesch@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Ильмаст Николай Васильевич

ведущий научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: ilmast@krc.karelia.ru
тел. (8142) 571879

Немова Нина Николаевна

директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической
биохимии, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: nemova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 783615

Churova, Maria

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: mchurova@yandex.ru
tel. (8142) 571879

Mescheryakova, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: mesch@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Ilmast, Nikolai

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: ilmast@krc.karelia.ru
tel. (8142) 571879

Nemova, Nina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru
tel. (8142) 783615