

УДК 597.2/.5:577.151.04:574.24

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ СЕВЕРНЫХ ВОДОЕМОВ

Е. В. Борвинская, Л. П. Смирнов, И. В. Суховская, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН

В статье приводятся данные сравнительного анализа активности глутатион S-трансферазы (GST), фермента второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, в печени, мышцах, почках и жабрах щук (*Esox lucius* L.), сига (*Coregonus lavaretus* L.) и плотвы (*Rutilus rutilus* L.), выловленных из чистого водоема и водоема, загрязненного отходами железорудного производства. Исследованы видовая специфика активности фермента, а также зависимость показателей активности от возраста изучаемых рыб. Результаты свидетельствуют о чувствительности GST к минеральному загрязнению и указывают на активацию механизмов биохимической адаптации гидробионтов под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды.

Ключевые слова: глутатион S-трансфераза, рыбы, минеральное загрязнение, экологический мониторинг.

E. V. Borvinskaya, L. P. Smirnov, I. V. Sukhovskaya, N. N. Nemova. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN SOME NORTHERN FRESHWATER FISHES: THE EFFECT OF WATER MINERALIZATION

The comparative studies of glutathione S-transferase (GST) activity were performed on liver, muscles, kidneys and gills of pike (*Esox lucius* L.), whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) from a reference lake and the polluted mining factory lake. Species and age variability was also investigated. GST activity was found to be altered in the polluted area compared with the reference lake. We supposed that the altered GST activity is probably a metabolic adaptation of fish tissues to primarily mineral contamination.

Key words: glutathione S-transferase, fish, water mineralization, ecological monitoring.

Введение

На водоем обычно действует целый комплекс экологических факторов, поэтому натурные исследования воздействий различного рода часто более объективны, чем модельные [Pandey et al., 2008; Fernandes et al., 2008]. Рыбы, как известно, являются удобными объектами при исследовании влияния

различных ксенобиотиков, в том числе токсических, на живой организм [Кашулин и др., 1999; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005]. Они аккумулируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют сравнительно большие размеры и продолжительность жизни, обладают повышенной устойчивостью к ксенобиотикам, поэтому могут быть использованы для

прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы.

Способность рыб к выживанию в изменяющихся условиях среды во многом зависит от диапазона адаптивных возможностей комплекса защитных систем организма, в том числе двухфазной системы биотрансформации ксенобиотиков. Функционирование этой системы осуществляется через каскадное взаимодействие набора ферментов, участвующих в обезвреживании токсических веществ, одним из которых является глутатион S-трансфераза (GST). Модифицирующее действие на активность GST многих чужеродных соединений техногенного происхождения, таких как полиароматические углеводороды, хлорированные бифенилы, тяжелые металлы и др., делают перспективным применение этого фермента в качестве биомаркера антропогенного воздействия на биоту [Blanchette et al., 2007; Левина и др., 2007; Борвинская и др., 2009]. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии изменения минерального состава среды на активность GST. Кроме того, очень мало работ связано с изучением особенностей функционирования этого фермента у рыб, являющихся обитателями пресноводных экосистем Субарктики.

Задача настоящего исследования – изучение активности GST у пресноводных рыб, выловленных из водоемов с разным уровнем минерализации.

Материал и методы

В работе использованы три вида пресноводных рыб: щука (*Esox lucius* L.), сиг (*Coregonus lavaretus* L.) и плотва (*Rutilus rutilus* L.).

Материал собирали в июне 2009 и 2010 г. в озерах, расположенных на севере Республики Карелия. Оз. Костомукшское (64°61' с.ш., 30°47' в.д.) используется Костомукшским горнообогатительным комбинатом для сброса промывных вод и захоронения пылеобразных фракций пустой породы (хвостов обогащения). В настоящее время вода в озере отличается аномально высокой минерализацией (до 646 мг/л), в основном за счет ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , а также большим количеством мелкодисперсной минеральной взвеси (1,34 мг/л) [Состояние водных объектов..., 2007; Ильмаст и др., 2010]. Размерно-весовые характеристики (АС, вес) пойманных в этом озере рыб: щука 31,5–50 см, 264–923 г; сиг 22–32,5 см, 101–770 г; плотва (АД, вес) 13–17,5 см, 50–71 г. Возраст рыб составлял 3–8 лет для щуки, 4–12 лет для сига и 5–8 лет для плотвы. В 2010 г. в хвостохранилище отловлены рыбы со следующими характеристиками без разделения по полу: щука 38,2–47,5

см, 437–1374 г; сиг 18,5–23,2 см, 62–112 г; плотва 13,3–14,5 см 42–50 г. Возраст рыб составлял 3–5 лет.

В качестве контроля использовали рыбу, выловленную в тот же период из чистого оз. Каменное (64°28' с.ш., 30°13' в.д.), которое расположено на территории Костомукшского государственного заповедника и считается эталонным водоемом таежной зоны. Общая минерализация воды в озере составляет около 11 мг ионов на литр [Состояние водных объектов..., 2007]. Размерно-весовые характеристики рыб из улова 2009 г.: щука 46–78 см, 815–3000 г; сиг 19–31 см, 51–292 г; плотва 15,8–24,6 см, 61–284 г. Возраст рыб составлял 5–9 лет для щуки, 2–6 лет для сига и 5–11 лет для плотвы. В 2010 г. отловлены щука 47,6–56,2 см, 834–1374 г; сиг 18,8–23,8 см, 60–115 г; плотва 14,1–15,7 см, 52–63 г. Возраст 3–5 лет.

Активность GST определяли в печени, мышцах, почках и жабрах рыб. Органы извлекали сразу после вылова и хранили до анализа в жидком азоте. Образцы ткани измельчали с помощью гомогенизатора Поттера-Эльвейэма в 0,125 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 6,5), взятом в соотношении 1:10 – 1:900 в зависимости от типа ткани. Гомогенат центрифугировали при 11000g в течение часа при 4°C на ультрацентрифуге Optima 80L (Beckman, USA). Активность фермента регистрировали в надосадочной жидкости по возрастанию оптической плотности (D_{340}) продукта конъюгации 1-хлоро-2,4-динитробензола (CDNB) с восстановленным глутатионом (GSH) [Habig et al., 1974]. Концентрацию белка в супернатанте оценивали по поглощению при 205 нм [Noble and Bailey, 2009; Суховская и др., 2010], используя бычий сывороточный альбумин и восстановленный глутатион в качестве стандартов при построении калибровочного графика. Относительную активность GST рассчитывали по количеству μ моль CDNB, превращенного ферментом за 1 мин в пересчете на мг белка в цитозоле.

Статистическая обработка данных велась с применением многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA) и рангового коэффициента корреляции Спирмена. Порог доверительной вероятности при оценке достоверности различий принят равным 0,95. Данные представлены в таблицах в виде медиан значений.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов за 2009 г. показал, что исследованные виды рыб по-разному реагируют на изменение минерального состава среды (табл. 1). Так, у плотвы, выловленной из оз. Костомукшское, не было выявлено статистически значимых изменений в активности GST, хо-

тя в жабрах и почках наблюдалась тенденция к снижению активности фермента по сравнению с рыбами из контрольного водоема. У сигов различия между вариантами выявлены только в почках (активность GST у опытных рыб ниже в 2,4 раза), но при заданном $p \leq 0,05$ они также статистически не значимы.

Между щуками из опытного и контрольного водоемов статистически достоверные отличия по исследованному показателю выявлены в жабрах и почках. У щук из сильноминерализованного оз. Костомукшское активность GST была в 1,8 раза (жабры) и 4,9 раза (почки) выше, чем у рыб из контрольного озера.

В мышцах всех исследованных видов рыб различия между вариантами эксперимента были несущественными либо отсутствовали.

Так как использованная в экспериментах рыба имела большой возрастной диапазон, был проведен корреляционный анализ, который показал наличие положительной зависимости между возрастом и активностью GST в мышцах щук, выловленных в 2009–2010 гг. из оз. Костомукшское ($r_s = 0,71$) и в 2009 г. из оз. Каменное ($r_s = 0,65$). В жабрах щук из оз. Каменное в 2009 г. корреляция была отрицательной ($r_s = -0,52$), а в жабрах сигов из уловов 2009 г. в оз. Костомукшское выявлена сильная положительная зависимость ($r_s = 0,78$). В отличие от полученных нами результатов, другие исследователи [Larose et al., 2008; Ирейкина, 2008] не выявили зависимости между активностью GST и возрастом у таких рыб, как окунь, ряпушка и камбала.

Из уловов 2010 г. для анализа была отобрана рыба с небольшими различиями по длине, весу и возрасту. В ряде тканей активность GST у рыб в 2010 г. была выше по сравнению с 2009 г., например, в почках плотвы независимо от места

вылова (в 3–11 раз) и жабрах плотвы из оз. Каменное (в 4 раза) (табл. 2). Если в 2009 г. у рыб, отловленных в оз. Костомукшское, активность фермента в жабрах и почках была ниже, а в печени выше, чем в контроле, то в 2010 г. вектор изменений показателей активности был противоположным. Тем не менее анализ активности GST в тканях плотвы, выловленных из водоема с высоким уровнем минерализации в 2010 г., так же как и в 2009 г., не выявил каких-либо существенных различий по сравнению с рыбами из контрольного водоема.

Более высокая активность GST в мышцах и почках рыб из уловов 2010 г. по сравнению с предыдущим годом обнаружена также у сига и щуки. Причина этого явления пока неясна. Вероятно, этот феномен может быть связан с влиянием на рыбу комплекса внешних факторов – климатических условий, гидрологического и гидрохимического режимов, существовавших в том или ином году в период сбора материала.

В экспериментах 2010 г. были использованы сига, имевшие близкие размерно-весовые характеристики и возраст. Активность GST в жабрах, мышцах и почках имела сходные значения и только в печени рыб она была достоверно ниже у сигов из опытного водоема по сравнению с контролем.

Статистически значимое повышение активности фермента в жабрах и почках щук из опытного водоема, пойманных в 2009 г., сохранялось у рыб из уловов 2010 г. Полученные данные можно объяснить, на наш взгляд, участием GST в поддержании интенсивного метаболизма в этих тканях. В условиях минерального загрязнения (в 60 раз превышающего контроль) на жабры и почки ложится большая нагрузка по поддержанию солевого баланса в организме. Усиленный режим работы этих органов может быть причиной нако-

Таблица 1. Активность GST ($\mu\text{M CDNB/мин/мг белка}$) в тканях рыб из озер с разным уровнем минерализации (вылов 2009 г.)

Орган, ткань	Плотва		Сиг		Щука	
	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное
Жабры	16,03	29,71	9,41	8,94	834,00*	465,95
Мышцы	8,22	8,50	10,37	7,78	7,37	6,35
Печень	98,07	71,88	108,23	92,75	699,88	704,62
Почки	3,79	13,55	18,22	42,48	31,96*	6,59

* Здесь и в табл. 2 различия между вариантами эксперимента статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Таблица 2. Активность GST ($\mu\text{M CDNB/мин/мг белка}$) в тканях рыб из озер с разным уровнем минерализации (вылов 2010 г.)

Органы, ткань	Плотва		Сиг		Щука	
	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное	оз. Костомукшское	оз. Каменное
Жабры	68,97	50,94	10,49	11,10	623,97*	366,58
Мышцы	4,95	4,53	16,91	15,11	48,84	11,3
Печень	70,92	84,4	91,07*	103,69	938,82	830,52
Почки	41,56	38,73	48,46	44,59	45,68*	18,16

пления эндогенных токсинов, в том числе продуктов окислительного стресса, что в свою очередь является причиной активации ферментов системы детоксикации. Щука, являясь эвриотным видом, встречается в водоемах, существенно различающихся по минеральному составу, и приспособилась к обитанию в слабозвтрофизированных озерах Карелии с очень низким уровнем минерализации, которые формировались по мере отступления ледника. Тем не менее у этой рыбы сохранились механизмы поддержания гомеостаза в условиях повышенной минерализации, несмотря на то что щука заселила озера Карелии тысячи лет назад после завершения ледникового периода.

Обращает на себя внимание то, что активность GST у данного вида рыб в жабрах и печени в целом отличалась очень высокими значениями. Из табл. 1–2 видно, что в печени и жабрах щуки, облигатного хищника, она была существенно выше (в 10–92 раз), чем в тканях плотвы и сига, для которых характерно смешанное питание. Так как щука является конечным хищником в субарктических пресных водоемах, у нее могли эволюционно выработаться механизмы усиленной защиты от накопления токсикантов в пищевой пирамиде, что подтверждается данными других исследований по влиянию пищевой ориентации трофического уровня на активность ферментов детоксикации [Solé et al., 2009].

Из трех видов рыб, обитающих в оз. Костомукшское, плотва демонстрирует наиболее слабый ответ GST на внешнее воздействие. Это может указывать на низкий адаптационный потенциал детоксикационной системы этих рыб, что обуславливает большую чувствительность к антропогенному загрязнению. Нарушенное соотношение полов в популяции плотвы из оз. Костомукшское, где в уловах доминируют самки (90%) [Такшеев, 2005; Ильмаст и др., 2010], свидетельствует в пользу слабой устойчивости данного вида к негативным факторам, так как самцы, как правило, менее резистентны и начинают элиминироваться из водоемов, испытывающих значительную техногенную нагрузку [Лукин и др., 1984].

Хотя в тканях сига наблюдали изменение активности GST под влиянием техногенных вод, тем не менее различия были достоверны только в печени рыб, а тренд изменений отличался по годам. В свою очередь в почках и жабрах щуки различия между вариантами эксперимента были статистически значимы и имели межгодовую повторяемость, это позволяет сделать вывод о том, что активность GST в этих органах щуки может быть использована как один из маркеров реакции рыб северных водоемов на изменение минерального состава водной среды. Следует

отметить, что некоторые исследователи считают нецелесообразным применение GST как биомаркера загрязнения водной среды, так как в 77% лабораторных и полевых исследований не было зафиксировано однозначного ответа этого фермента на воздействие [Van der Oost et al., 2003]. При этом в подавляющем большинстве случаев изучалась активность GST только в печени рыб, тогда как другие органы оставались без внимания исследователей. Наши данные показывают, что изучение тканеспецифических особенностей функционирования молекулярных биомаркеров позволяет расширить список видов-индикаторов, которые могут быть использованы в экологическом мониторинге того или иного региона.

Таким образом, было выявлено влияние высокого уровня минерального загрязнения на активность GST у рыб. Изменение активности фермента, участвующего в детоксикации широкого ряда липофильных органических токсикантов, может указывать на неспецифическую реакцию организма в ответ на стресс, вызванный изменением ионного состава среды. Использование живыми системами неспецифических реакций в адаптациях к тем или иным факторам является благоприобретенной эволюционной особенностью, которая способствует минимизации метаболических трат при развитии защитных механизмов и повышает адаптивные возможности организмов.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что активность GST может быть использована в качестве дополнительного биохимического маркера при оценке состояния рыб – обитателей северных водоемов с повышенной степенью минерализации.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» НШ 3731.2010.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг.; Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» на 2009–2011 гг.

Литература

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.

Ильмаст Н. В., Стерлигова О. П., Такшеев С. А., Кучко Я. А. Плотва (*Rutilus rutilus*) Костомукшского хвостохранилища /// Проблемы изучения и сохранения позвоночных животных антропогенных водоемов: матлы Всерос. науч. конф. с междунар. участием. Са-ранск, 2010. С. 67–70.

Ирейкина С. А. Молекулярные биомаркеры антиоксидантной системы и биотрансформации загрязняющих веществ у рыб и моллюсков из импактных районов залива Петра Великого (Японское море): автореф... канд. биол. наук. Владивосток, 2008. 20 с.

Кашулин Н. А., Лукин А. А., Амудсен П. А. Рыбы пресных вод субарктики как биоиндикаторы техногенного загрязнения. Апатиты: Кольский научный центр РАН, 1999. 142 с.

Левина И. Л., Москвичев Д. В., Зинчук О. А. Экологические аспекты токсичности азоловых пестицидов для гидробионтов. Ростов-на-Дону, 2007. 180 с.

Лукин А. А., Моисеенко Т. И., Кашулин Н. А. Мониторинг природной среды Кольского Севера. Апатиты: Кольский филиал АН СССР, 1984. С. 58–63.

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2007. 210 с.

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.

Такшеев С. А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: дис... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2005. 122 с.

Blanchette B., Feng X., Singh B. R. Marine Glutathione S-Transferases // *Mar. Biotechnol.* 2007. Vol. 9, N 5. P. 513–542.

Fernandes C., Fontannhas-Fernandes A., Ferreira M., Salgado M.A. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008. Vol. 55. P. 262–269.

Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, N 22. P. 7130–7139.

Larose C., Canuel R., Lucotte M., Di Giulio R.T. Toxicological effects of methylmercury on walleye (*Sander vitreus*) and perch (*Perca flavescens*) from lakes of the boreal forest // *Comp. Biochem. Physiol.* 2008. Vol. 147. Part C. P. 139–149.

Noble J. E. and Bailey M.J. A. Quantitation of Protein // *Methods Enzymol.* 2009. Vol. 463. P. 73–95.

Pandey S., Parvez S., Ansari R.A. et al. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata Bloch* // *Chem. Biol. Interact.* 2008. Vol. 174, N 3. P. 183–192.

Solé M., Rodríguez S., Papiol V. et al. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables // *Comp. Biochem. and Physiol.* 2009. Vol. 149. Part C. P. 83–89.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen P.E. Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2003. Vol. 13. P. 57–149.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Борвинская Екатерина Витальевна

стажер-исследователь
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: katsu@inbox.ru
тел. (8142) 571879

Смирнов Лев Павлович

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

Суховская Ирина Викторовна

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

Немова Нина Николаевна

директор ИБ КарНЦ РАН, зав. лаб. экологической физиологии растений, 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

Borvinskaya, Ekaterina

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

Smirnov, Lev

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

Suhovskaya, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: suhovska@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