СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕКТОРЫХ БИОМАРКЕРОВ САМОК И САМЦОВ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS* LINNE *(*SCORPAENIDAE*)*, ОБИТАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И. И. Руднева[1], Н. Ф. Шевченко[1], И. Н. Залевская [2]

[1] *Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, Украина,*
e-mail: svg-41@mail.ru
[2] *Таврический национальный университет, г. Симферополь, Украина*

Исследовали самцов и самок морского ерша, обитающего в Стрелецкой бухте в районе Севастополя, характеризующейся высокой антропогенной нагрузкой. Не установлено существенных различий в содержании каротиноидов и показателей перекисного окисления липидов в печени обоих полов, но у самок была выше концентрация витамина А. Активность антиоксидантных ферментов крови также одинакова у обоих полов, но в сыворотке крови самцов обнаружен дополнительный компонент (Кэф = 0,47–0,51). Обсуждается вопрос о влиянии загрязнения на морфологические и биохимические покзатели рыб разного пола.

Введение

Антропогенное загрязнение крайне негативно отражается на процессах репродукции рыб, непосредственно влияет на протекание гаметогенеза и формирование половых продуктов (Корниенко и др., 1998). Помимо известных фактов, констатирующих повреждающее действие ксенобиотиков на гаметогенез, икру и личинок рыб (Овен и др., 2000; Руднева, 2000), особое значение приобретают исследования действия загрязнителей на гормональную систему. Ранее нами было показано, что в гонадах рыб в значительных количествах концентрируются ксенобиотики и, в частности, ПХБ, которые модифицируют липидный состав половых желез, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы (Руднева, Жерко, 2000). Повышенные концентрации ПХБ, ДДТ и других хлорорганических соединений (ксеноэстрогенов), химическая структура которых имеет сходство со структурой половых гормонов рыб, стимулируют в организме самцов синтез вителлогенина (VTG), являющегося предшественником компонентов желтка икры (Mills et al., 200; 1Schreck et al; 2001; Schultz et al., 2001). Это явление отмечено у рыб, обитающих в акваториях, загрязненных сбросами сточных вод (Folmar et al., 2001; Lye et al., 1997). Появление в плазме крови самцов вителлогенина приводит к нарушениям процессов гаметогенеза, вплоть до появления бисексуальных особей и инверсии пола (Minier et al., 2000). Совершенно очевидно, что изменение гормонального статуса организма рыб под действием ксенобиотиков нарушает развитие и созревание гонад. В этом случае информативными показателями репродуктивного здоровья рыб служат биохимические параметры, характеризующие содержание половых гормонов в крови (Kokokiris et al., 2000; Roberts et al., 1999).

Вместе с тем загрязнители, содержащиеся в воде, индуцируют развитие стрессовых состояний, что усугубляет ситуацию и ослабляет здоровье рыб. В частности, происходит активация ПОЛ, продукты которых оказывают повреждающее действие на клеточные и молекулярные структуры (Владимиров, Арчаков, 1972; Руднева, 2000). При хроническом антропогенном воздействии наблюдаются ослабление иммунной системы (Coeurdacher et al., 1997), активация реакций трансформации и детоксикации ксенобиотиков (McArdle et al., 2000), морфо-физиологические изменения в популяциях рыб (Корниенко и др., 1998; Minier et al., 2000; Munkittrick, Dixon, 1989).

Принимая во внимание тот факт, что в случае тотального загрязнения морских акваторий прежде всего страдает репродуктивная система гидробионтов, интерес представляет сравнить некото-

рые биохимические параметры рыб и их зависимость от пола. Это позволит выяснить различия в процессах адаптации рыб к действию антропогенных факторов и использовать эту информацию в мониторинговых и популяционных исследованиях (Balk et al., 1996). С этой целью задачей данной работы явилось изучение морфологических и биохимических характеристик самок и самцов морского ерша, обитающего в прибрежной части в районе Севастополя.

Материалы и методы исследований

Материалом исследования служил морской ерш *Scorpaena porcus,* отловленный в Стрелецкой бухте в районе Севастополя в весенне-летний период 1998–2002 годов. Анализировали размерно-массовый состав рыб разного пола, стадию зрелости гонад рыб (Правдин, 1966). Кровь рыб отбирали пастеровской пипеткой из хвостовой артерии, отстаивали на холоду для получения сыворотки. Эритроциты после гемолиза в дистиллированной воде (соотношение 1:5) использовали для определения активности антиоксидантных ферментов.

Активность ферментов определяли спектрофотометрическими методами на спектрофотометре Specol 211 (Овен и др., 2000; Rudneva, 1997). Электрофорез белков сыворотки крови проводили в 7%-ном полиакриламидном геле (Davis, 1971). Белки окрашивали суданом черным в 7%-ной уксусной кислоте. Стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры) рассчитывали на основании коэффициента относительной электрофоретической подвижности фракций Кэф (Соркина, Руднева, 1976). Сравнение проводили как между стандартными ЭФ-спектрами, так и между статистическими показателями фракционного состава белков в ЭФ-спектрах.

Липиды печени экстрагировали смесью гексан:изопропанол в соотношении 2:1 на холоду (Верболович и др., 1989). Анализ содержания гидроперекисей липидов проводили по Каган и др. (1986), концентрацию ТБК-реактивных продуктов – по Стальной и Гаришвили (1977), содержание каротиноидов и витамина А – по Карнаухову и Федорову (1988). Статистическую обработку результатов проводили по Лакину (1990).

Результаты и их обсуждение

Стрелецкая бухта, расположенная в районе Севастополя, подвергается значительному антропогенному воздействию. Здесь находится сток ливневой канализации, кроме того, ежесуточно в бухту сбрасывается 350 м^3 сточных вод. Согласно данным Государственной инспекции охраны Черного моря, в воде бухты содержится 0,15–0,08 мг/л нефтепродуктов, 0,009 мг/л СПАВ, 0,07 мг/л железа, БПК$_5$ составило 2,9 мг/л. Совершенно очевидно, что хроническое загрязнение акватории отразилось и на жизнедеятельности ее обитателей и, прежде всего, на рыб, живущих здесь постоянно.

Результаты исследований позволили установить, что соотношение самок и самцов морского ерша составило 1:1,4. Размеры и масса рыб приведены в таблице 1. Длина рыб варьировала незначительно (CV 17,4–19,2 для самок и 13,3–13,9 для самцов), а масса изменялась в большей степени (CV соответственно выше – 53,3–58,5 и 53,6–58,7). Длина и масса самок морского ерша несколько превосходит длину самцов.

Таблица 1. **Размерно-массовый состав морского ерша (M ± m), обитающего в бух. Стрелецкой** (Черное море, район Севастополя)

Параметры	Самки, n=44	Самцы, n=64
Длина (L), см	11.6–28.2 16.6±0.7	9.9–20.7 14.9±1.5
Стандартная длина (l), см	8.0–18.0 13.2±0.7	8.8–15.0 12.3±0.4
Масса рыбы (P), г	17.5–446.0 84.8±14.5	12.9–168.0 55.8±5.9
Масса тушки (p), г	15.9–318.0 76.9±11.0	13.0–152.6 47.9+5.4

Известно, что белки, формирующие гонады и гаметы, синтезируются в печени. Кроме того, печень является основным органом, где происходят процессы детоксикации, в которых специализированные молекулярные системы гепатоцитов играют существенную роль в защите организма от последствий окислительного стресса. В частности, важное значение имеет содержание низкомолекулярных антиоксидантов, в частности, каротиноидов и витамина А. В то же время о состоянии свободнорадикальных процессов в данном органе можно судить по количеству продуктов ПОЛ. В связи с этим представляло интерес изучить уровень ПОЛ в печени и содержание в ней низкомолекулярных антиокислителей (табл. 2).

Уровень продуктов ПОЛ не имеет существенных различий в печени самок и самцов. Та же тенденция отмечена и для содержания каротиноидов, тогда как концентрация витамина А достоверно выше у самок по сравнению с самцами.

Таблица 2. **Параметры перекисного окисления липидов и содержание антиоксидантов в печени морского ерша** (M±m)

Параметры ПОЛ и содержание антиоксидантов	Самки	Самцы	Различие, p
Каротиноиды, Мкг/г липидов	3.29±0.27	2.98±0.18	Н/д
Витамин А, Мг/100 г липидов	8.64±0.49	5.16±0.86	<0.05
Гидроперекиси липидов, мкг иода/мг липидов	8.97±1.15	9.71±0.41	Н/д
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг липидов	9.35±1.30	8.36±0.85	Н/д

Примечание: н/д – различие недостоверно.

Так как ксенобиотики попадают в организм из окружающей среды прежде всего в кровь и разносятся с ее током (иногда в комплексе с сывороточными белками) в различные органы, представляло интерес выяснить особенности состояния активности ферментной антиоксидантной системы и электрофоретического состава белков сыворотки крови рыб в зависимости от пола. Изменение активности антиоксидантных ферментов крови рыб приведены в таблице 3.

Таблица 3. **Активность антиоксидантных ферментов крови морского ерша** (на мл/мин, M±m)

Ферменты	Самки		Самцы	
	Стадия Ш n=25	Стадия IV n=18	Стадия Ш n=13	Стадия IV n=45
СОД, условные единицы х 10^2	26.45±2.41	28.15±5.3	27.41±3.44	28.91±1.89
Каталаза, мг H_2O_2	12.85±1.25	9.28±1.42	15.48±2.42	13.14±1.29
Пероксидаза, оптические единицы х 10^2	1.22±0.34	32.83±1.00	7.86±0.31	28.63±0.19
Глутатионредуктаза НАДФН, нмоль	29.24±4.90	29.72±5.74	40.21±6.77	26.54±2.53

Активность антиоксидантных ферментов в крови имеет сходство у самок и самцов морского ерша и практически не зависит от стадии зрелости. Можно отметить некоторую тенденцию увеличения активности глутатионредуктазы у самцов на стадии Ш как по сравнению с самками, так и по отношению к показателям самцов на стадии IV.

Среднестатистические стандартные ЭФ-спектры белков сыворотки крови также имеют сходство у самцов и самок. В то же время в ЭФ-спектрах сыворотки самцов обнаружен компонет в посттрансферриновой области (Кэф=0.47–0.51), который отсутствует в сыворотке крови самок. Существенных различий между показателями вариации фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови у самок и самцов морского ерша также не обнаружено (табл. 4). Однако следует отметить большую гетерогенность ЭФ-спектров сыворочных белков самцов по сравнению с показателями самок.

Таблица 4. **Статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови морского ерша**

Параметры числа фракций в ЭФ-спектрах	Самки n=18	Самцы n=21
Пределы числа фракций в ЭФ-спектрах	9–18	11–17
Среднее число фракций в ЭФ-спектрах, M±m	15.0±0.9	4.2±0.6
Количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них	6	7
Коэффициент вариации, CV,%	16.7	18.1
Число «редких» вариантов, % к общему числу фракций	21.1	23.8
Пределы электрофоретической подвижности	0.00–1.02	0.00–1.06

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили установить, что между самками и самцами морского ерша существуют определенные различия, которые в наибольшей степени проявляются в период созревания гонад и нереста. Известно, что в печени самок рыб происходит синтез белков желтка икры (в том числе вителлогенина), которые затем попадают в кровь и доставляются в гонады для формирования икринок (Fujita et al., 1998). Кроме того, в печени аккумулируются каротиноиды, поступающие из пищи, и синтезируется витамин А. Эти компоненты также необходимы для формирования гонад и икры. Одновременно в печени самок установлено большее по сравнению с самцами содержание витамина А, тогда как уровень каротиноидов одинаков в печени обоих полов. Ранее нами было отмечено, что содержание витамина А и антиоксидантная активность липидов в гонадах самок также выше, чем у самцов, но концентрация каротиноидов и активность антиоксидантных ферментов одинакова (Руднева, 2000)

Нами не обнаружено достоверных различий показателей ПОЛ в печени и активности антиоксидантных ферментов в крови самок и самцов морского ерша. Можно предположить, что в условиях загрязнения среды обитания, которой является Стрелецкая бухта, существенных различий в ответных реакциях самок и самцов рыб на хроническое антропогенное воздействие нет. Сходные результаты были получены нами на разных видах черноморских рыб (Руднева, Скуратовская, 2009) и другими исследователями при изучении показателей ПОЛ в клетках гепатоцитов самцов и самок камбалы при действии на них различных ксенобиотиков в экспериментальных условиях (Winzor et al.,

2001). В то же время воздействие некоторых хлорорганических соединений позволяло выявить дифференцированный ответ показателей ПОЛ в клетках печени самцов и самок, и был сделан вывод, что нельзя исключать возможности модуляции путей детоксикации ксенобиотиков в печени в зависимости от пола. Было показано, что опухоли печени у самок камбалы встречаются чаще, чем у самцов (Landwust et al., 1996).

Дополнительную информацию о состоянии организма могут дать исследования белкового состава сыворотки крови. Сывороточные белки обладают способностью образовывать комплексы с ксенобиотиками, что приводит к их модификации и изменению белковых электрофоретических спектров, перераспределению компонентов и их соотношения (Львов, Гераскин, 1998). Кроме того, в кровь попадают гормоны, обеспечивающие нормальный процесс репродукции или же свидетельствующие о его нарушении (Folmar et al., 2001). Так например, появление в сыворотке крови самцов рыб, обитающих в загрязненных акваториях, вителлогенина, является следствием существенной деструкции репродуктивного процесса (Schreck et al., 2001; Schultz et al., 2001). Одновременно отмечено снижение ГСИ, появление бисексуальных особей и инверсиии пола (Minier et al., 2000). В наших исследованиях в сыворотке крови рыб установлена дополнительная фракция в ЭФ-спектрах сыворотки самцов, что может быть также связано с определенными модификациями сывороточных белков самцов в результате долговременного антропогенного воздействия. Показатели вариации числа фракций существенно не различаются у обоих полов, но у самцов отмечена тенденция к их увеличению.

На основании представленных данных можно заключить, что в процессе репродукции у самок и самцов морского ерша наблюдаются определенные различия как в размерно-массовых характеристиках, так и в белковых спектрах сыворотки крови, которые в основном обусловлены различием в метаболизме разных полов при созревании гонад. В то же время нельзя исключить модифицирующего действия антропогенного загрязнения на морфо-физиологические и биохимические показатели разнополых рыб.

Литература

Верболович В. П., Подгорный Ю. М., Теплова Л. Л., Куркаев Р. М. Экстракция липидов для количественной комплексной оценки свободнорадикального окисления // Лабор. Дело. 1989. 12, С. 57–59.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972.

Каган В. Е., Орлов А. И., Прилипко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. // Итоги развития науки и техники. Сер. биофизика. М.:ВИНИТИ. 1986.

Карнаухов В. Н., Федоров Г. Г. Методы определения содержания каротиноидов и витамина А в тканях животных. Методические рекомендации. Пущино. 1982. С. 15–18.

Корниенко Г. Г., Кожин А. А., Воловик С. П., Макаров Э. В. Экологические аспекты биологии репродукции. Ростов-на-Дону. Из-во «Эверест». 1998. С. 8–17.

Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 250 с.

Львов В. Л., Гераскин П. П. Электрофоретический состав сывороточных белков самок севрюги в условиях загрязнения Каспийского моря // 42 научная конф. профессорско-преподавательского состава Астрахань. 1998. С. 24.

Овен Л. С., Руднева И. И., Шевченко Н. Ф. Ответные реакции черноморского ерша *Scorpaena porcus* на антропогенное воздействие // Вопросы ихтиологии. 2000. Т. 40. № 1. С. 75–78.

Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая Промышленность. 1966.

Руднева И. И. Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва, МГУ. 2000.

Руднева И. И., Жерко Н. В. Действие полихлорированных бифенилов на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов в гонадах черноморской скорпены *Scorpaena porcus* // Экология. 2000. № 1. Р. 70–73.

Руднева И. И., Скуратовская Е. Н. Половые особенности активности антиоксдантных ферментов некоторых прибрежных видов рыб Черного моря. // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49, № 1 С. 125–128.

Соркина Д. А., Руднева И. И. Сравнительная характеристика белковых и липопротеидных спектров сыворотки крови черноморских рыб. // Молекулярная биология и медицинская генетика. Труды КМИ. 1976. 66. № 1. С. 61–63.

Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1977.

Balk L., Larsson A., Forlin L. Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances // Marine Environmental Research. 1996. V. 42, N 1–4. P. 203–208.

Coeurdacher J.L., Ppepin J.F., Fauvel C., Legall P., Bourmaud A.F., Romestand Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrachus labrax L.*) sera following injection with killed *Vibrio anguillarm* // Fish and Shellfish Immunology. 1997. V. 7. N 3. P. 151–160.

Davis B.J. Disk electrophoresis. ii. Method and application in human serum proteins. // Ann. New York.Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404.

Folmar L.C., Gardner G.R., Schreibman M.P., Magliulo-Cepriano L, Mills L.J., Zaroogian G., in male summer flounder *Paralichthys dentatus* // Aquatic Toxicology. 2001. V. 51, n 4. P 431–441.

Fujita T., Takemura A., Takano K. Immunochemical detection of precursor proteins of yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus*.// J. Fish Biol. 1998. V. 52, N 5. P. 1229–1240.

Kokokiris L., Mourot B., Menn F.L., Kentouri M., Fostier A. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pargus pargus* (*Teleostei, Sparidae*) // Fish Physiology and Biochemistry. 2000. V. 23, N 1. P. 1–11.

Landwust C.V., Holst S., Moller H., Anders K., Momme M. Fischkrankheiten in der Nordsee, Umwelybundesamt Nr.106 03 900, UBA Texte 57/96, ISSN 0722-186X, Umweltbundeesamt Berlin. 1996. P. 1–557.

Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., McCormic D. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works // Mar. Pollution Bull. 1997. V. 34, N 1. P. 34–41.

McArdle M., Elskus A., McElroy A., Larsen B., Benson W., Schlenk D. Estrogen CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent // Marine Environmental Research. 2000. V. 50. P. 175–179.

Mills L.J., Gutjahr-Gobell R.E., Haebler R.A., Borsay Horowitz D.J., Jayaraman S., Pruell R.J., McKinney R.A., Gardner G.R., Zaroogian G.E. Effects of estrogenic (o,p'-DDT; octylphenol) and antiandrogenic (p,p'-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder Paralichthys dentatus //Aquatic Toxicology. 2001. V. 52, n 2. P. 157–176.

Minier C., Caltot G., Leboulanger F., Hill E.M. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions // Analysis. 2000. V. 28.n 9. P. 801- 805.

Munkitrick K.R., Dixon D.G. A holistic approach to ecosystem health assessment using fish population characteristics // Hydrobiologia. 1989. V. 188/189. P. 123–125.

Roberts S.B., Jachson L.F., King W.V., Taylor R.G., Grier H.J., Sulliovan C.V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation // Trans. Ann. Fish. Soc. 1999. V. 128, n 3. P. 436–445.

Rudneva I.I. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V. 118 C. N 2. P. 225–230.

Schreck C., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture. 2001. V. 197 (1–4). P. 3–24.

Schultz I.R., Ozner G., Merdink J.L., Skillman A. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascullar administration of 17^{α}-ethynylestradiol // Aquatic Toxicol. 2001. V. 51, N 3. P. 305–318.

Winzer K., Winston G.W., Becker W., Van Npoorden C.J.F., Kohler A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus L.*) // Aquatic Toxicology. 2001. V. 52. P. 143–155.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MALE AND FEMALE OF SCORPION FISH (*SCORPAENA PORCUS*) EXPOSED IN CHRONIC ANTHROPOGENIC IMPACT

I.I. Rudneva[1], N.F. Shevchenko[1], I.N. Zalevskaya[2]

[1] *Institute of the Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Ukraine,*
e-mail: svg-41@mail.ru
[2] *Biochemistry Department of the National Tavrichessky University, Simpheropol, Ukraine,*

Males and females of scorpion fish (*Scorpaena porcus*) caught in highly polluted Streletskaya Bay (Sevastopol) were studied. Carotenoid concentrations and lipid peroxidation parameters in liver were the similar in male and female. In female vitamin A level was greater as compared with male liver. Blood antioxidant enzyme activities were the similar in both sex also, but in male blood serum the additional protein component (Kef = 0.47–0.51) was determined. The impact of environmental stress on fish male and female morphological and biochemical parameters was discussed.