

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА НА СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ МУСКУЛАТУРЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ

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

Учреждение Российской академии наук

Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,

e-mail: levps@rambler.ru

Введение

В последние десятилетия во многих странах уделяется большое внимание фундаментальным и прикладным исследованиям влияния факторов загрязнения окружающей среды на организм человека и животных (под ред. Ивановой, 1983).

Антропогенное воздействие на экосистемы, в том числе и на водные, постоянно усиливается, что вызывает необходимость изучения ответных реакций их обитателей и определение допустимых пределов этих воздействий (Папина, 2001).

Очень часто токсикантами являются тяжелые металлы (ТМ), такие как: ртуть, кадмий, свинец, стронций, никель, алюминий и другие. Загрязнение водоемов тяжелыми металлами – один из самых распространенных видов техногенного прессинга (Папина, 2001). Эта проблема особенно актуальна для рыб, поскольку они, во-первых, чаще всего не могут покинуть зону загрязнения из-за ограничений, определяемых размерами водоема, и, во-вторых, подвергаются воздействию тяжелых металлов не только через пищеварительную и дыхательную системы, но и через кожные покровы.

Патологические изменения, возникающие на уровне макромолекул и клеточных структур в результате взаимодействия с тяжелыми металлами, могут передаваться по цепочке до самых «высоких» уровней организации живого: популяций и целых биогеоценозов, поэтому возникает потребность в понимании биохимических механизмов защиты против повреждающих агентов на разных ступенях метаболизма (Лав, 1976).

В этом аспекте изучение участия низкомолекулярных соединений пептидной природы в процессах детоксикации ТМ очень перспектив-

но, так как для них установлен полифункциональный статус (Жуков, 1989).

Материалы и методы исследования

Методом жидкостной хроматографии низкого давления на носителе Toyopearl 40S были проведены исследования качественных и количественных вариаций фракционного состава низкомолекулярных пептидов (с молекулярной массой менее 10 кДа) мускулатуры плотвы *Rutilus rutilus* L. и щуки *Esox lucius* L., выловленных в озере Каскесозеро и хвостохранилище Костомукшского ГОКа.

Озеро Каскесозеро – небольшое, достаточно глубоководное (до 35 м) олиготрофное озеро с площадью около 6 км². pH поверхностных вод этого водоема по нашим измерениям составляет 5,5–6,5. Активная хозяйственная деятельность на побережье отсутствует. Кроме плотвы и щуки в этом озере обитают окунь и налим, интродуцированы и успешно прижились сиг и рипус (*Coregonus albula* L.). Озеро Каскесозеро в наших исследованиях условно принято за «контрольный» водоем.

Функционирование горнорудного производства в г. Костомукше связано с воздействием на окружающую среду и прежде всего на водные экосистемы. Источником загрязнения в районе промузла являются, главным образом, техногенные воды системы оборотного водоснабжения. Для захоронения «хвостов» и оборотного водоснабжения комбината на базе близлежащего озера было создано хвостохранилище, которое более чем за 15 лет эксплуатации комбината превратилось в водохранилище объемом 430 млн м³ и площадью 34 км² (Пальшин и др., 1994). Главной особенностью ионного состава

вод хвостохранилища следует считать аномально высокое содержание калия (113,4–233,6 мг/мл – превышение фоновой концентрации в 40 раз), которое мало менялось с течением времени. Кроме калия в воде хвостохранилища превышены предельно допустимые концентрации (ПДК) для рыбохозяйственных водоемов по сульфатам, литию и марганцу. Необычной является величина отношения эквивалентных концентраций K:Na, равная 5,62 в 1998 г., а также преобладание группы щелочных металлов над щелочноземельными (2,3:1) (Состояние водных объектов Республики Карелия, 2007), что приво-

дит к заметному защелачиванию воды (по нашим измерениям pH поверхностных вод колеблется в пределах 8–8,5). В настоящее время ихтиофауна представлена в основном плотвой (*Rutilus rutilus* L.), щукой (*Esox lucius* L.) и сигом (*Coregonus lavaretus* L.).

Результаты исследования

В составе низкомолекулярных пептидов, экстрагированных из мышц плотвы, выявлено 5 основных фракций, которые можно разделить на 10 подфракций (рис. 1).

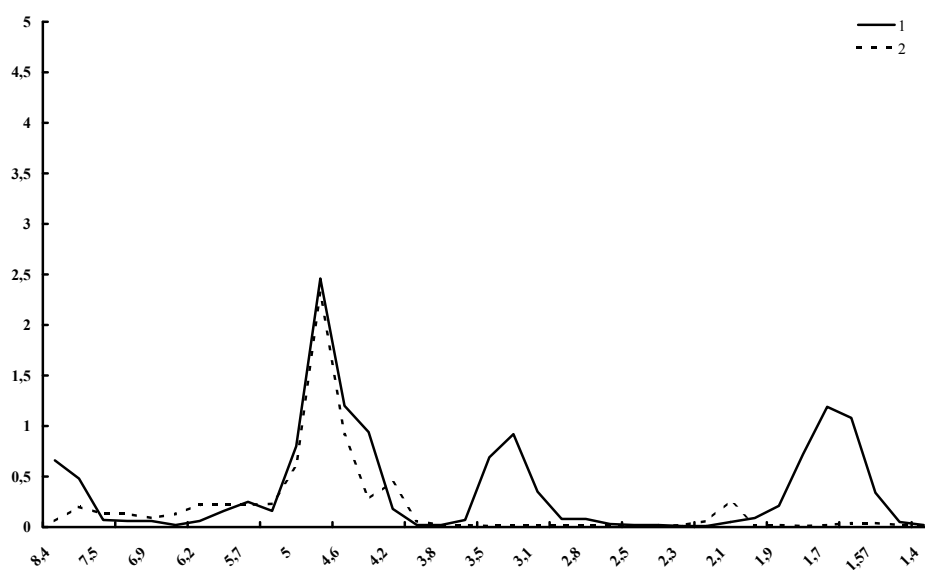


Рис. 1. Хроматограмма низкомолекулярных пептидов мышц плотвы

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 210 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

В таблице 1 приведены результаты количественного анализа состава низкомолекулярных пептидов. Показаны существенные различия между рыбами, отловленными в Каскесозере и в так называемом «хвостохранилище» Костомукшского ГОКа. В мышцах плотвы из контрольного водоема в большинстве фракций

уровень пептидов был выше, чем у рыб из загрязненного. Во фракциях с Мм $3,3 \pm 0,2$ и $1,7 \pm 0,1$ кДа уровень различий был очень высоким (20–100 раз). А во фракциях с Мм 4,2 и 2,1 кДа концентрация пептидов у особей из хвостохранилища была в 5–7 раз выше, чем у таковых из Каскесозера.

Таблица 1. Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях пептидов мускулатуры плотвы, выловленной из Каскесозера (1) и хвостохранилища Костомукшского ГОКа (2)*

Номера фракций												
Водоем	1	2				3			4	5		
	Молекулярные массы, кДа											
	5	4,5±0,3				3,3±0,2			2,1	1,7±0,1		
		4,8	4,6	4,4	4,2	3,5	3,3	3,1		1,8	1,7	1,6
1	63,1	198,0	95,7	79,4	6,3	55,0	77,6	20,0	1,9	56,2	89,3	100,0
2	47,7	219,0	77,6	14,6	31,6	1,1	1,1	1,1	13,2	1,1	1,1	1,1

* Ошибка среднего (m) для фракций с высоким содержанием пептидов не превышала ± 5 –10% среднего (M), для минорных фракций достигала $\pm 50\%$.

Анализ оптической плотности низкомолекулярных фракций, экстрагированных из мышц плотвы, на длине волны 250 нм, характерной для меркаптидных связей, показал очень низкую оптическую активность пептидов на этой длине волны у рыб из хвостохранилища по сравнению с рыбами из контрольного водоема, что хорошо видно на рис. 2. Кратность различий между вариантами эксперимента по разным фракциям составляла 1,4 – 22 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о неблагоприятном воздействии на белковый метаболизм плотвы комплекса химических компонентов, входящих в состав техногенных вод, которые Костомукшский ГОК, накапливает в хвостохранилище.

На рисунке 3 представлены хроматограммы фракционного состава низкомолекулярных пептидов мускулатуры щук, выловленных из разных водоемов. Выявлено качественное сходство хроматограмм мышечной ткани щук их исследу-

дованных водоемов практически по всем выделенным пептидным фракциям. Исключение составила фракция с Мм 3,7 кДа, которая у рыб из контрольного водоема визуально четко не выражена, но тем не менее количественно определялась (табл. 2).

Как показал сравнительный анализ концентрации НМ пептидов во фракциях, у щук из контрольного водоема концентрация пептидов в мышцах в низкомолекулярной части спектра была выше, чем у таковых из загрязненного водоема в 2,2–5,2 раза (фракции с Мм 4,4; 4,2; 2,2 и 2,1 кДа). В высокомолекулярной части спектра (фракции с Мм 4,8–5,7 кДа) у щук из Каскесозера выявлено в 1,1–3,6 раза меньше пептидов, чем у таковых из хвостохранилища. Наиболее сильные отличия выявлены во фракции с Мм 3,7 кДа (рис. 3). У рыб из загрязненного водоема концентрация пептидов в этой фракции была в 79 раз выше, чем у особей из чистого.

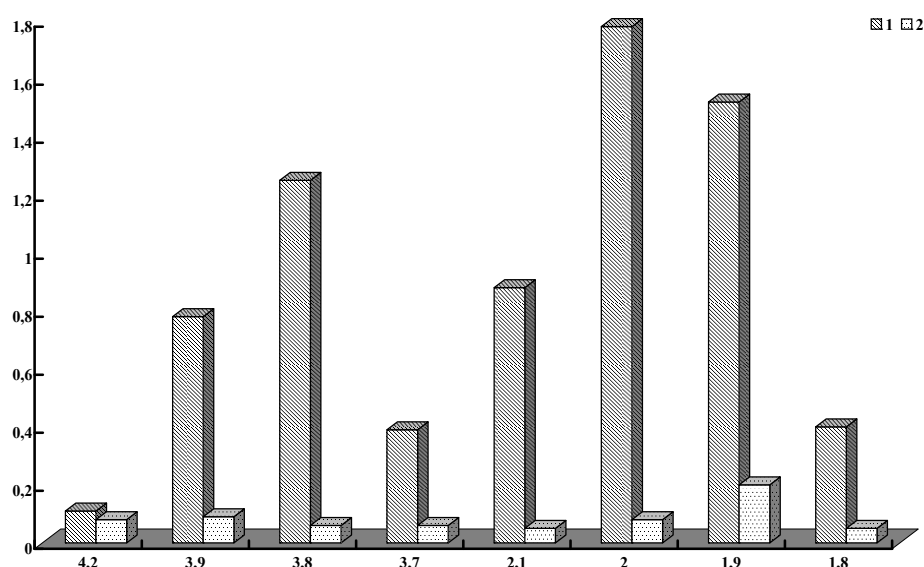


Рис. 2. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта низкомолекулярных пептидов из мышц плотвы

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОК; по оси ординат – оптическая плотность при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Таблица 2. Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях пептидов мускулатуры щуки, выловленной из Каскесозера (1) и хвостохранилища Костомукшского ГОКа (2)*

Водоем	Молекулярные массы, кДа									
	5,7	5,3	5	4,5±0,3				3,7	2,2	2,1
				4,8	4,6	4,4	4,2			
1	10,7	174,2	109,7	418,9	400,0	89,1	20,0	1,1	66,1	38,0
2	38,0	227,6	204,7	448,8	409,3	31,6	4,0	87,1	12,6	17,4

* Ошибка среднего (m) для фракций с высоким содержанием пептидов не превышала ±5–10% среднего (M), для минорных фракций достигала ±50%.

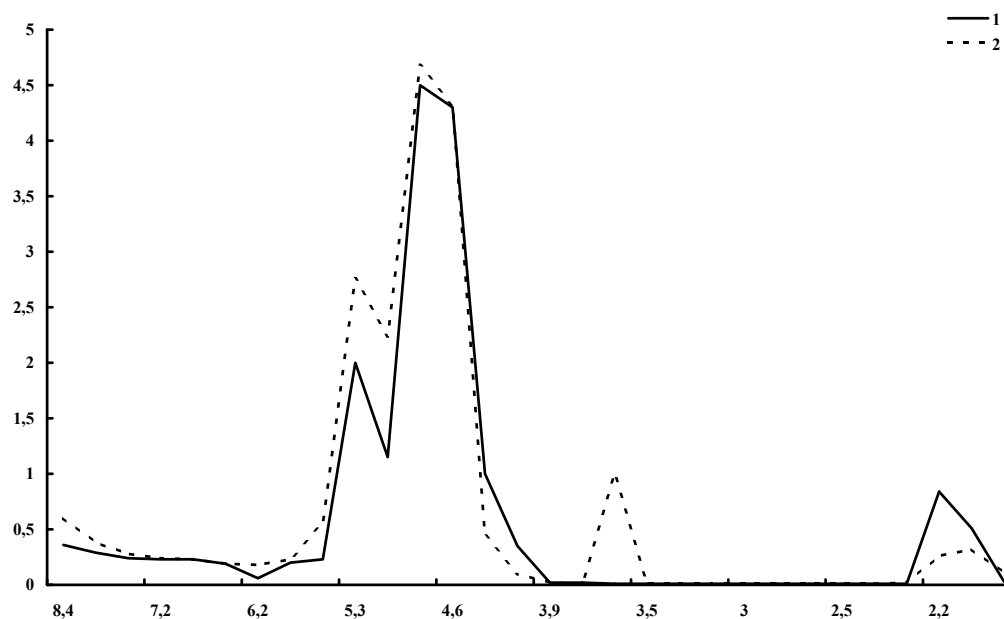


Рис. 3. Хроматограмма низкомолекулярных пептидов мышц щуки

1 – из оз. Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 207 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Количественный анализ компонентов пептидного пула мускулатуры щук при 250 нм показал, что в мышцах рыб из хвостохранилища, во всех фракциях уровень оптически активных на этой длине волны соединений был в 1,6–6 раз выше, чем у особей из Каскесозера (рис. 4). Эти данные, по нашему мнению, если принять вероятность

соответствия роста оптической активности при 250 нм и доли сульфгидрильных групп, об адекватной биохимической ответной реакции организма щук на уровне НМ пептидов мускулатуры на экологически неблагоприятный гидрохимический состав водной среды, сложившийся в хвостохранилище Костомукшского ГОКа.

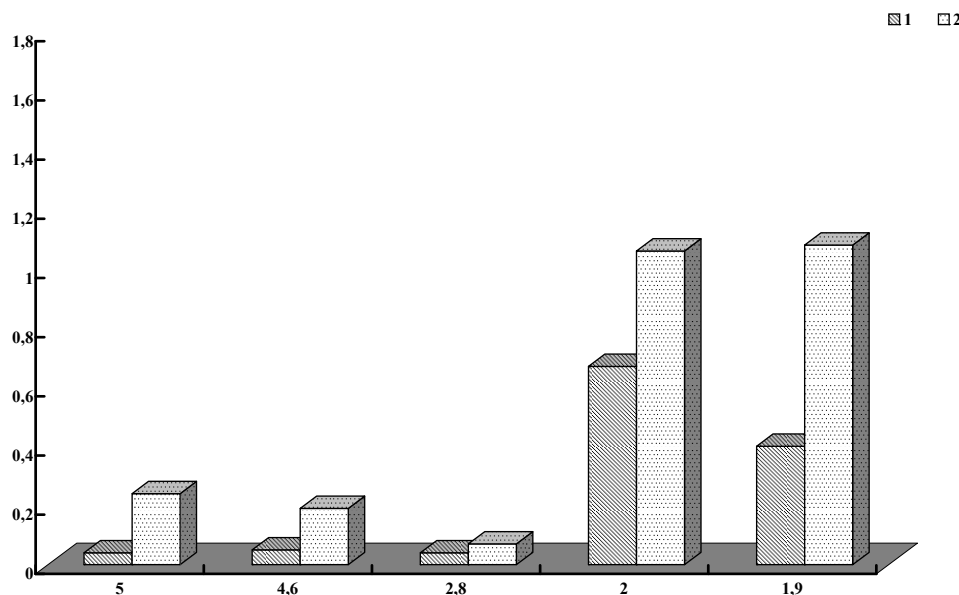


Рис. 4. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта низкомолекулярных пептидов из мышц щуки

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа.

Заключение

Выяснение биохимических механизмов развития адаптивных реакций у животных является важным аспектом решения одной из фундаментальных проблем биологии – взаимодействия организма и среды. Результаты таких исследований могут иметь несомненное значение для выяснения как специфических, так и общих механизмов развития адаптационного процесса.

Следует отметить разный характер ответной реакции плотвы и щуки, выловленной в хвостохранилище Костомукшского ГОКа, на тип загрязнения, существующий в данном водоеме. У плотвы из хвостохранилища практически во всех фракциях пептидов, выделенных из мускулатуры, происходило снижение как общей доли пептидов, определяемых по оптической плотности при 207 нм, так и компонентов, оптически активных при 250 нм, по сравнению с таковыми рыб из Каскесозера. У щуки из этого водоема снижение доли общих пептидов наблюдали только в четырех фракциях из десяти, а в остальных доля пептидов в мышечном экстракте была выше, чем у особей из Каскесозера. Оптическая активность при 250 нм у рыб из

хвостохранилища во всех выявленных фракциях была выше, чем у щуки из чистого водоема. Суть этого феномена не вполне понятна и, возможно, кроется в различной экологии этих видов.

Существует гипотеза (Карелин, 2003) о том, что пептидный пул организма является носителем информации о биохимическом статусе ткани. Поэтому расширение знаний о роли низкомолекулярных пептидов может иметь важное значение для оценки состояния организмов и решения проблем биоиндикации природных сред. Количественные соотношения компонентов пептидных спектров могут быть использованы в качестве одного из биохимических тестов при определении степени антропогенной нагрузки на живые организмы.

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

Жуков П. И. Справочник по экологии пресноводных рыб. Минск: Наука и техника. 1989. 310 с.

Карелин А. А. Тканеспецифические пептидные пулы как элемент информационной системы организма // Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. М. 2003. С. 19.

Лав Р. М. Химическая биология рыб: Мир. 1976. 349 с.

Пальшин Н. И., Сало Ю. А., Кухарев В. И. Влияние Костомукшского ГОКа на экосистему р. Кенти. Гидрологические и гидрохимические аспекты // Ис-

следование и охрана водных ресурсов бассейна Белого моря (в границах Карелии). Петрозаводск. 1994. С. 140–161.

Папина Т. С. Транспорт и особенности распределения тяжелых металлов в речных системах. Новосибирск: Наука. 2001. Серия «Экология». Вып. 62. 58 с.

Пептиды // Под. ред. Ивановой В. Т. М.: 1983. 438 с.

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

THE EFFECT OF INDUSTRIAL WATERS OF MINING FACTORY ON LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDE'S COMPOSITION OF SOME SPECIES OF FISHES

I.V. Sukhovskaya, E.V. Borvinskaya, L.P. Smirnov

*Institute of biology, Karelian Research Centre of RAS, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: levps@rambler.ru*

By method of low pressure liquid chromatography on Toyopearl TSK HW-40S the qualitative and quantitative composition of low molecular weight peptides (10 kDa and lower) of pike and roach muscles from reservoirs with different ecological conditions (industrial water of

mining plant and clear lake) was investigated. Quantitative change in composition of components enriched with sulf-hydryl groups was revealed. Received data show that pike protein metabolism in condition of sharp shift of $\text{Na}^+:\text{K}^+$ balance to K^+ violate in essentially lower degree than in roach.