

УДК 574.632

А. П. Попов, Л. В. Поликарпова, А. С. Коничев

**АКТИВНОСТЬ НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
В ТКАНЯХ ЛЕЩА И СИНЦА ИЗ РЫБИНСКОГО
ВОДОХРАНИЛИЩА¹**

Исследована активность кислых ДНКазы и РНКазы в печени и жабрах леща и синца на разных участках Рыбинского водохранилища. Самый высокий уровень активности ферментов у леща выявлен в наиболее чистых районах водохранилища. Предполагается, что угнетение активности кислых нуклеаз в тканях леща может рассматриваться в качестве маркера токсического загрязнения вод. Почти полное отсутствие зависимости между загрязнением среды и активностью нуклеаз у синца делает затруднительным использование этого вида рыб для биохимической индикации загрязнения водоемов.

Ключевые слова: Рыбинское водохранилище, загрязнение, рыбы, ДНКазы, РНКазы, биоиндикация.

Прогрессирующее антропогенное поступление в окружающую среду токсичных веществ остро ставит проблему адаптивных возможностей биоты и мониторинга состояния водных экосистем, что обуславливает актуальность исследований реакций водных организмов на загрязнение. Отклик на токсическое воздействие происходит на всех уровнях организации живых систем, от популяционного до молекулярного, поэтому в современных исследованиях для оценки воздействия токсикантов на гидробионтов широко применяются биохимические показатели. Одним из таких показателей является активность кислых гидролаз, которая в клетках живых организмов связана главным образом с функционированием лизосомального аппарата, обеспечивающего ауто- и гетерофагию, аутолиз, клеточную экскрецию и, отчасти, апоптоз. Поскольку все эти процессы могут быть индуцированы интоксикацией и все они заканчиваются разрушением субклеточных и молекулярных структур, изменение активности кислых гидролаз является одним из наиболее универсальных маркеров сдвигов метаболизма, возникающих при действии опасных веществ [1, 2, 6, 8, 12].

¹ Работа выполнена при содействии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Авторы выражают признательность зав. лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН, д. б. н. Г. М. Чуйко за предоставленный биологический материал.

© Попов А. П., Поликарпова Л. В., Коничев А. С., 2012

Рыбинское водохранилище — один из крупнейших искусственных пресноводных водоемов Европы — является интересным объектом для проведения экотоксикологических исследований. В Рыбинском водохранилище выделяют четыре основных района (плеса) — Волжский, Моложский, Шекснинский и Главный, первые три из которых располагаются по долинам соответствующих рек и представляют собой вытянутые, сравнительно узкие участки. Установлено, что воды основных питающих водохранилище рек (Волги, Мологи и Шексны), поступая в водоем замедленного водообмена, продолжительное время сохраняют свои свойства, и лишь в центральной части водохранилища в результате трансформации речных вод формируется новая водная масса, отличная по характеристикам от всех исходных. В результате водные массы различного происхождения отчетливо прослеживаются в водохранилище в течение всего года и занимают в годовом цикле (с некоторыми колебаниями по сезонам) определенные его участки, что обуславливает существенные гидрохимические различия между отдельными районами водоема [9]. Многочисленные исследования показали пространственную неравномерность загрязнения Рыбинского водохранилища такими токсикантами, как тяжелые металлы, полиароматические углеводороды, полихлорированные бифенилы, хлорорганические пестициды и др. Установлено, что основным локальным источником химического загрязнения водоема является Череповецкий индустриальный комплекс, наиболее загрязненным районом — Шекснинский плес, наиболее чистым — Моложский плес [3, 10, 11, 15].

Целью настоящей работы являлось изучение активности кислых дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) и рибонуклеазы (РНКазы) в печени и жабрах леща и синца — двух наиболее массовых видов рыб в Рыбинском водохранилище, объектов промышленного рыболовства — из различных по степени антропогенной нагрузки районов водоема.

Материал и методика исследований. Объектом исследования служили лещ (*Abramis brama L.*) и синец (*Abramis ballerus L.*), выловленные траловым методом на различных участках Рыбинского водохранилища. Вылов производился с экспедиционного судна ИБВВ РАН «Академик Топчиев» в конце июля 2008 г. (лещ: станции Первомайка, Волково, Коприно, Мякса) и начале июля 2009 г. (лещ: станции Первомайка, Мшичино, Городок, Любец; синец: станции Первомайка, Мякса, Любец) (рисунок). Исследованию подвергались особи без морфологических патологий и паразитарных инвазий. После отлова у рыб препарировали печень и жабры, органы немедленно замораживали и хранили при -18°C в течение 3 недель. Для биохимического анализа использовали экстракты водорастворимых белков из соответствующих тканей, активность кислых ДНКазы и РНКазы определяли спектрофотометрически по приросту продуктов деградации ДНК и РНК соответственно [7, 14]. Учитывая видовую и тканевую специфичность ферментов, активность нуклеаз в каждом конкретном случае определяли при предварительно установленных оптимальных значениях рН инкубационной смеси. Определенный нами рН-оптимум действия ДНКазы печени и жабр леща составлял 5,2, ДНКазы тканей синца — 5,4, РНКазы в печени и жабрах у обоих видов — 5,6.

В качестве субстрата для определения активности ДНКазы использовали 0,1%-ный раствор высокополимерного препарата ДНК из тимуса теленка («Sigma», США), денатурированного нагреванием (100°C, 15 мин) с последующим быстрым охлаждением в ледяной бане. Инкубационная смесь содержала 0,1 мл субстрата, 0,8 мл 50 мМ ацетатного буфера и 0,1 мл экстракта белков. Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37°C, затем пробы охлаждали 10 мин при +4°C, после чего негидролизованную ДНК осаждали добавлением 2 мл 5%-ного раствора хлорной кислоты. Пробы выдерживали 1 ч при +4°C и центрифугировали при 8000g в течение 15 мин при комнатной температуре. Супернатанты фотометрировали против контроля, в который экстракт белков вносили после прибавления раствора хлорной кислоты.

Инкубационная смесь для определения активности РНКазы содержала 50 мкл 0,2%-ного раствора РНК из пекарских дрожжей («Sigma», США), 400 мкл 50 мМ ацетатного буфера и 50 мкл экстракта белков. Пробы инкубировали 1 ч при 37°C, охлаждали 10 мин при +4°C, после чего негидролизованную РНК осаждали прибавлением 1 мл 0,15 М раствора хлорида магния в 75%-ном этаноле. Пробы выдерживали 1 ч при –4°C, полученные осадки отделяли центрифугированием при 8000g и –4°C в течение 20 мин. Супернатанты фотометрировали против контроля, в который экстракт белков вносили после прибавления раствора осадителя.

За единицу активности нуклеаз принимали такое количество фермента, которое вызывало увеличение поглощения при 260 нм на 1 единицу после 1 ч инкубации при 37°C. Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах активности на 1 мг белка, определенного по методу Лоури и др. [13]. Статистическую обработку результатов проводили по Стьюденту.

Результаты исследований и их обсуждение

Предварительно проведенные нами исследования показали, что у леща и синца не наблюдается значимых различий по изучаемым биохимическим показателям между самками и самцами, что позволило проводить дальнейшие исследования без учета половой принадлежности рыб. Полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях по уровню активности кислых нуклеаз между лещами, обитающими на разных участках водохранилища. По результатам исследований 2008 г., наиболее высокие значения активности кислой ДНКазы и кислой РНКазы в печени и жабрах были отмечены у лещей, выловленных на станции Первомайка (табл. 1). В остальных районах активность нуклеаз у лещей относительно этих величин имела тенденцию к угнетению, наиболее явно выраженную в Шекснинском плесе (станция Мякса), где все изученные показатели были достоверно ниже таковых в Первомайке. В частности, на станции Мякса зафиксирован самый низкий уровень нуклеазной активности в печени леща, при этом активность кислой ДНКазы оказалась достоверно снижена относительно данных не только по станции Первомайка, но и по станции Коприно. Несколько меньше, но также статистически достоверно относительно уровня на станции Первомайка, оказалась снижена активность ДНКазы в печени лещей на станции Волково. Активность ДНКазы в жабрах наиболее низка у рыб, вылов-



Карта-схема Рыбинского водохранилища со станциями отлова рыб.

ленных на станциях Коприно и Мякса, угнетение активности РНКазы в этой ткани отмечено у рыб на станциях 2—4 (см. табл. 1).

По результатам экспедиции 2009 г., активность кислой РНКазы в печени лещей на станциях Первомайка и Мшичино оказалась выше, чем у рыб, выловленных на станциях Любец (Шекснинский плес) и Городок (Главный плес). В то же время не было обнаружено существенной разницы по уровню активности кислой ДНКазы в печени рыб на указанных станциях (табл. 2).

У синца не обнаружено существенных различий по большинству исследованных биохимических параметров. Исключением является уровень активности кислой ДНКазы в жабрах, который у синцов на станции Мякса оказался достоверно ниже, чем на станции Первомайка (табл. 3).

1. Активность кислых нуклеаз у леща из разных районов Рыбинского водохранилища (июль 2008 г.), $n = 10$

Станции вылова	ДНКаза, усл. ед/мг белка		РНКаза, усл. ед/мг белка	
	печень	жабры	печень	жабры
1. Первомайка	3,16 ± 0,36 (2,4)*	7,23 ± 0,63 (3,4)	9,83 ± 0,46 (4)	18,11 ± 1,56 (2,3,4)
2. Волково	2,02 ± 0,19 (1)	6,36 ± 0,17 (3,4)	9,00 ± 0,71	14,29 ± 0,79 (1)
3. Коприно	2,52 ± 0,29 (4)	5,13 ± 0,25 (1,2)	9,25 ± 0,47	12,98 ± 0,55 (1)
4. Мякса	1,69 ± 0,13 (1,3)	5,30 ± 0,17 (1,2)	8,27 ± 0,44 (1)	14,44 ± 1,05 (1)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 представлены средние значения и стандартные ошибки ($x \pm S$); * активность фермента достоверно ($p \leq 0,05$) отличается от активности на станции с указанным цифровым индексом.

2. Активность кислых нуклеаз в печени леща из разных районов Рыбинского водохранилища (июль 2009 г.)

Станции вылова (количество особей)	ДНКаза, усл. ед/мг белка	РНКаза, усл. ед/мг белка
1. Первомайка (16)	2,96 ± 0,20	9,27 ± 0,69 (3,4)
2. Мшичино (20)	2,57 ± 0,09	9,50 ± 0,40 (3,4)
3. Городок (18)	2,57 ± 0,13	8,12 ± 0,57 (1,2)
4. Любец (21)	2,59 ± 0,12	7,86 ± 0,27 (1,2)

3. Активность кислых нуклеаз в тканях синца, выловленного на разных участках Рыбинского водохранилища (июль 2009 г.)

Станции вылова (количество особей)	ДНКаза, усл. ед/мг белка		РНКаза, усл. ед/мг белка	
	печень	жабры	печень	жабры
1. Первомайка (16)	1,98 ± 0,11	3,76 ± 0,17 (2)	3,61 ± 0,18	8,21 ± 0,33
2. Мякса (6)	1,83 ± 0,16	3,16 ± 0,10 (1)	3,99 ± 0,30	7,82 ± 0,52
3. Любец (15)	2,05 ± 0,11	3,40 ± 0,17	3,64 ± 0,14	8,14 ± 0,28

Нетрудно заметить, что наиболее высокий уровень активности кислых нуклеаз у лещей наблюдается в наименее загрязненной области водохранилища (станции Мшичино и Первомайка, представленные моложскими водами [9]), самый низкий — в Шекснинском плесе, а в остальных районах имеет промежуточные значения. Это позволяет предположить, что угнетение активности кислых нуклеаз в тканях леща обусловлено антропогенным загрязнением соответствующих участков Рыбинского водохранилища, при этом выраженность наблюдаемых изменений находится в прямой зависимости от фактического уровня загрязнения конкретных районов. Эти резуль-

таты хорошо соотносятся с данными о содержании малонового диальдегида (МДА) и активности ферментов антиоксидантной системы (АОС) в печени лещей, полученными параллельно в ИБВВ РАН [5] на тех же особях рыб, которые были изучены нами по результатам экспедиции 2008 г. Так, лещи, выловленные на станции Первомайка, характеризовались самым низким содержанием МДА и высокой активностью ферментов АОС. У лещей на станциях Любец и Мякса, напротив, содержание МДА в печени было повышенным, а активность ферментов АОС угнетена. Эти данные позволяют говорить о нарушении равновесия между про- и антиоксидантными процессами в тканях лещей, обитающих в Шекснинском плесе, что, очевидно, обусловлено загрязнением среды обитания рыб [5].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что уровень активности кислых нуклеаз у леща может служить не менее информативным показателем хронической интоксикации, чем широко используемые в практике биоиндикации маркеры перекисного окисления липидов. Выявленное нами снижение активности кислых нуклеаз в тканях лещей из загрязненных мест обитания, видимо, обусловлено угнетением обмена веществ в целом (и обмена нуклеиновых кислот, в частности) и является отражением неблагоприятного физиологического состояния рыб. При этом некоторые особенности в соотношении различных биохимических показателей наблюдались как на разных станциях, так и по годам исследования. Так, на станции Коприно активность кислых нуклеаз у лещей отчетливее снижена в жабрах, а на станции Волково — в печени (см. табл. 1); в 2008 г. в тканях лещей более выраженными оказались колебания активности ДНКазы, тогда как в 2009 г. у рыб на исследованных станциях не выявлено значимых отличий по величине данного показателя (см. табл. 1, 2). Видимо, все это является отражением лабильности метаболизма на фоне действия на рыб комплекса экзогенных и эндогенных факторов.

В то же время у синцов, выловленных на разных по степени загрязнения участках Рыбинского водохранилища, почти не обнаружено отличий в уровне активности нуклеолитических ферментов (см. табл. 3). Очевидно, этот факт связан с различиями в биологии двух исследованных видов. В частности, значение может иметь тип питания рыб. Синец является планктофагом и стайной пелагической рыбой. Лещ, будучи бентофагом, не только постоянно контактирует с загрязненными донными осадками, но и как вид находится на более высокой ступени экологической пирамиды и, соответственно, биоаккумуляции токсикантов (в частности, по данным [11], содержание полихлорированных бифенилов в мышцах леща в Шекснинском плесе на порядок выше, чем на станции Первомайка). Наблюдаемые различия также могут быть связаны с миграционной активностью исследуемых видов. Лещ, как известно, не совершает больших миграций, что позволяет, в том числе, использовать этот вид рыб для биоиндикации токсического загрязнения вод [4]. В частности, в Рыбинском водохранилище популяция леща состоит из отдельных локальных стад, приуроченных к определенным нерестовым участкам. Каждую группировку составляют оседлые рыбы, не уходящие далеко от нерестилищ, и кочующие, миграционная активность которых, однако, четко выражена только в предзимовальный и преднерестовый периоды; в июне — июле (время проведения наших исследований) большинство взрос-

лых рыб и молоди находятся на нагуле в своих нерестовых районах [9]. Синец, напротив, характеризуется значительной миграционной активностью [9]. В этой связи его «слабая» реакция на загрязнение среды может объясняться трудностью получения биологического материала с привязкой к конкретным участкам водоема. Возможно, эта реакция может проявиться при сравнительных исследованиях более широких выборок особей данного вида.

Заключение

Уровень активности нуклеолитических ферментов (кислой ДНКазы, кислой РНКазы) является информативным показателем физиологического состояния леща и может рассматриваться в качестве биохимического критерия для характеристики токсических свойств водной среды. Почти полное отсутствие связи между загрязнением среды и активностью кислых нуклеаз в тканях синца определяется, видимо, биологическими особенностями данного вида рыб, что делает затруднительным использование синца для биохимической индикации загрязнения водоемов.

**

Досліджено активність кислих ДНКаз та РНКаз в печінці і зябрах ляща і синця на різних ділянках Рибінського водосховища. Найвищий рівень активності ферментів у ляща виявлено у найчистіших ділянках водосховища. Припускається, що пригнічення активності кислих нуклеаз у тканинах ляща можна розглядати як маркер токсичного забруднення води. Майже повна відсутність залежності між забрудненням середовища і активністю нуклеаз у синця робить утрудненим використання цього виду для біохімічної індикації забруднення водоемів.

**

The activities of acid DNAse and acid RNAse were determined in branchiae and liver of common bream and blue bream from different areas of Rybinsk Reservoir. The highest activity of nucleases in common breams was detected at the pure areas of the reservoir. The depression of acid nucleases activity may probably serve as marker of toxic pollution of waters. A almost complete lack of dependence between pollution surroundings and activity of nucleases in blue bream create difficulty to use this species of fish for biochemical indication of reservoir pollution.

**

1. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. — М.: Наука, 2008. — 284 с.
2. Зиньковский О.Г., Потрохов А.С., Евтушенко Н.Ю. Влияние меди и марганца на нуклеазную активность органов и тканей производителей карпа в репродуктивный период // Гидробиол. журн. — 1995. — Т. 31, № 4. — С. 76—82.
3. Козловская В.И., Герман А.А. Полихлорированные бифенилы и полиароматические углеводороды в экосистеме Рыбинского водохранилища // Вод. ресурсы. — 1997. — Т. 24, № 5. — С. 563—569.

4. Моисеенко Т.И., Гашкина Н.А., Шарова Ю.Н., Покоева А.Г. Экоотоксикологическая оценка последствий загрязнения вод р. Волги // Там же. — 2005. — Т. 32, № 4. — С. 1—15.
5. Морозов А.А., Чуйко Г.М., Погорная В.А. Функциональное состояние антиоксидантной системы печени леща (*Abramis brama* L.) из районов Рыбинского водохранилища с различной степенью антропогенной нагрузки // III Всерос. конф. по вод. токсикологии, конф. по гидроэкологии и школа-семинар: Объед. материалы, Борок, 11—16 окт. 2008 г. — Борок, 2008. — Т. 2. — С. 101—105.
6. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. — М.: Наука, 2004. — 216 с.
7. Попов А.П., Коничев А.С., Цветков И.Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) // Прикл. биохимия и микробиология — 2003. — Т. 39, № 5. — С. 518—523.
8. Попов А.П., Цветков И.Л., Коничев А.С. Разделение и характеристика дезоксирибонуклеаз гепатопанкреаса живородки речной в норме и при модельной интоксикации *in vivo* // Биохимия. — 2008. — Т. 73, вып. 8. — С. 1161—1167.
9. Рыбинское водохранилище и его жизнь — Л.: Наука, 1972. — 364 с.
10. Флеров Б.А., Томилина И.И., Кливленг Л. и др. Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. — 2000. — № 2. — С. 148—155.
11. Чуйко Г.М., Законов В.В., Бродский Е.С. и др. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и рыбе из Рыбинского водохранилища // III Всерос. конф. по вод. токсикологии, конф. по гидроэкологии и школа-семинар: Объед. материалы, Борок, 11—16 окт. 2008 г. — Борок, 2008. — Т. 1. — С. 86—89.
12. Юровицкий Ю.Г., Сигоров В.С. Эколого-биохимический мониторинг и эколого-биохимическое тестирование в районах экологического неблагополучия // Изв. АН. Сер. биол. — 1993. — № 1. — С. 74—82.
13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randal R.L. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 2. — P. 265—275.
14. Rassel W., Khorama H. Studies on polynucleotides. X. Enzyme degradation. Some properties and mode of action of spleen phosphodiesterase // Ibid. — 1961. — Vol. 236, N 4. — P. 1144.
15. Siddall R., Robotham P.W.J., Gill R.A. et al Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (ПАХ) concentrations in bottom sediments and liver tissue of bream (*Abramis brama*) in Rybinsk Reservoir, Russia // Chemosphere. — 1994. — Vol. 29, N 7. — P. 1467—1476.