УДК 577.152.321:597.552.1:[504.5:628.3](470.22)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ У ЩУК, ОБИТАЮЩИХ В ВОДОЕМАХ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Вдовиченко Е.А., Высоцкая Р.У.

Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, e-mail: elizaveta.vdovichenko@gmail.com

Проведены исследования по изучению влияния техногенных вод железорудного производства на активность лизосомальных гликозидаз (β-глюкозидазы, β-галактозидазы) и содержание белка у рыб, обитающих в водоемах с разной степенью антропогенной нагрузки. В качестве объектов исследования были выбраны щуки *Esox lucius* из хвостохранилища Костомукшского ГОКа и оз. Окуневого – первого после хвостохранилища в озерно-речной системе Кенти-Кенто. В него попадают воды, профильтровавшиеся через дамбу, отделяющую оз. Окуневое от хвостохранилища. Воды хвостохранилища отличаются по своему составу от оз. Окуневого, т.к. помимо растворенных минеральных компонентов в них присутствуют остатки горной породы и взвеси. Сравнение проводили с аналогичными биохимическими показателями рыб, выловленных из оз. Каменного, находящегося на территории заповедника и не подвергающегося загрязнению техногенными водами комбината. Показано, что активность β-глюкозидазы понижалась у щук, обитающих в водоемах, испытывающих значительную антропогенную нагрузку, по сравнению с рыбами из чистого водоема. Активность же β-галактозидазы резко возрастала у щук из водоемов, загрязненнных техногенными водами Костомушского ГОКа. Это является особенностью адаптации организма щуки на уровне изученных ферментов по отношению к данному типу минерального загрязнения. Содержание белка практически во всех органах самцов и самок щуки из оз. Окуневого было значительно ниже, чем у рыб из хвостохранилища и оз. Каменного. В работе показана зависимость биохимических реакций от пола и состава техногенных вод.

Ключевые слова: лизосомальные гликозидазы, β-глюкозидаза, β-галактозидаза, минеральное загрязнение, щука

THE COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL GLYCOSIDASES OF PIKES LIVING IN WATER OBJECTS WITH DIFFERENT RATES OF ANTHROPOGENIC LOAD

Vdovichenko E.A., Vysotskaya R.U.

Institute of Biology of Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, e-mail: elizabeth104@rambler.ru

The effect of iron ore production wastewater on the activity of lysosomal glycosidases(β-glucosidase, β-galactosidase) of organisms living in water objects with different rates of anthropogenic load was studied. We have chosen pikes Esox lucius living in Okunevoe lake and Kostomuksha ore-dressing and processing enterprise tailing pond as objects under study. Okunevoe lake is located further than tailing pond in the river-lake sysmem Kenti-Kento. Wastewater filtered through the dam which isolates Okunevoe lake from the Kostomuksha tailing pond gets to Okunevoe lake. There is also wastewater which gets to this lake under periodic outflows of anthropogenic water through the branch ducts. Tailing pond water and water from Lake Okunevoe differ in kind. It means that water from the lake consists of soluble mineral components while water from the tailing pond is composed of soluble mineral compotents, rock pieces and suspensions. Pikes living in Lake Kamennoe used as a control. Lake Kamennoe is located in the area of national park and not exposed to pollution. It was shown that the activity of β-glucosidase decreased at organisms living in water objects exposed to ore-dressing and processing enterprise water than pikes living in fresh water.posed to this type of mineral pollution. The activity of β-galactosidase irrupted at pikes living in water objects exposed to Kostomuksha ore dressing and processing enterprise pollution. There is a feature of enzymes studied to this type of mineral pollution. The protein content was significantly lower at pikes living in Lake Okunevoe than in Lake Kamennoe and tailing pond. It was shown the dependence of biochemical reactions on sex and wastewater composition.

Keywords: lysosomal glycosidases, β-glucosidase, β-galactosidase, mineral pollution, pike

Водные экосистемы в настоящее время представляют собой наиболее загрязняемые природные объекты, так как в них аккумулируются загрязнения как поступающие со сточными водами промышленных предприятий, так и переносимые с воздушными массами. В Карелии одним из таких объектов, испытывающих значительную антропогенную нагрузку, является озерно-речная система Кенти-Кенто. Основным источником загрязнения данной системы являются сточные воды Костомукшского горно-обогатительного комбината. Верхнее озеро системы (Костомукшское) используется для хранения отходов производства. По химическому составу воды хвостохранилища отличаются высокой минерализацией (с преобладанием ионов калия, сульфатов и гидрокарбонатов), аномальным соотношением щелочных и щелочноземельных катионов и наличием взвеси размолотой горной породы (Лозовик и др., 2003). Следует отметить, что произошедшие за время работы комбината (с 1982 г.) изменения в минеральном составе вод системы Кенти-Кенто привели к существенным изменениям со-

стояния биоты оз. Костомукшского, в частности, к обеднению видового состава ихтиофауны (Такшеев, 2005; Высоцкая и др., 2011). Так как хвостохранилище через р. Кенти связано с 10 другими озерами данной озерно-речной системы, то техногенные воды ГОКа оказывают влияние на экосистемы нижележащих водоемов. Одним из таких озер является оз. Окуневое – первое после хвостохранилища в озерно-речной системе Кенти-Кенто. В него попадают воды, профильтровавшиеся через дамбу, отделяющую оз. Окуневое от хвостохранилища, а также при периодических попусках техногенной воды по отводным каналам. Поэтому в настоящей работе в качестве объектов исследования были выбраны щуки *Esox lucius,* обитающие в оз. Каменное, на которое не оказывают влияние сточные воды ГОКа, а также в оз. Окуневое и в хвостохранилище. Для исследования были взяты самцы и самки щуки второй стадии зрелости гонад и возраста 5–7 лет.

Рыбы являются наиболее подходщими объектами исследования, позволяющими оценить процессы трансформации водоемов, поскольку показатели состояния популяций и организмов рыб отражают состояние окружающей среды. Ранее в наших исследованиях было показано, что важная роль в клеточных адаптациях к изменению факторов внутренней и внешней среды, в том числе в осуществлении защитных функций организма, принадлежит лизосомальным ферментам, в том числе ферментам углеводного обмена, поскольку углеводы являются самой распространенной группой органических соединений и выполняют в живых организмах множество важнейших функций (Такшеев, 2005; Высоцкая, Немова, 2008). Целью данной работы являлось изучение роли лизосомальных гликозидаз (β-галактозидазы и β-глюкозидазы) в разных органах щук, обитающих в водоемах с разным уровнем загрязнения отходами горнообогатительного комбината.

Активность ферментов и содержание белка определяли в почках, печени, жабрах, гонадах и мышцах рыб. Гомогенаты, приготовленные на 0,25 М растворе сахарозы с добавлением ЭДТА и неионного детергента тритона Х-100, подвергали центрифугированию при 10 000 g на центрифуге с охлаждением. При определении активности β-галактозидазы использовали в качестве субстрата раствор п-нитрофенил-β,D-галактопиранозида, β-глюкозидазы – раствор п-нитрофенил-β,D-глюкопиранозида на цитратном буфере. Активность обеих гликозидаз выражали в микромолях п-нитрофенола, освободившегося в условиях реакции за единицу времени (Высоцкая, Немова, 2008). Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами статистики, оценивая достоверность отличий по критерию U Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0{,}05$.

Активность β-глюкозидазы у щук из оз. Окуневого и хвостохранилища во всех органах была значительно ниже по сравнению со щуками из оз. Каменного. Активность фермента в печени, жабрах и мышцах у самцов в обоих водоемах, а также в почках самцов из хвостохранилища и гонадах самцов из оз. Окуневого была выше, чем у самок. Уменьшение активности данного фермента может служить следствием нарушения или изменения направленности отдельных реакций углеводного обмена (рис. 1). Следует отметить, что лизосомальные гликозидазы обладают широкой субстратной специфичностью и катализируют не только реакции гидролиза, но и трансгликозилирования. Их природными субстратами являются гликопротеины, протеогликаны, гликолипиды, полисахариды и другие вещества (van der Spoel et al., 2000, Spiro, 2002; Winchester, 2005). Кроме того, сами лизосомальные ферменты представляют собой гликопротеины. Гликозилированные белки и липиды участвуют в передаче сигналов, регуляции процессов обмена, защите организма от влияния химических и физических факторов. Учитывая вышесказанное, можно предположить их значительный вклад в защитные и приспособительные реакции в условиях воздействия промышленных поллютантов на обитателей водоемов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что адаптивные сдвиги в активности ферментов углеводного обмена под действием отходов железорудного производства происходят, прежде всего, в печени и жабрах самцов – органах, вносящих значительный вклад в приспособительные реакции организма рыб.

В отличие от β-глюкозидазы активность β-галактозидазы во всех органах щук из загрязненных сточными водами ГОКа водоемов была значительно выше по сравнению с особями, обитающими в чистом оз. Каменном (рис. 2). Это может свидетельствовать об активации определенной группы лизосомальных гидролаз и служить следствием вовлечения в адаптивные реакции щуки галактозсодержащих липидов и протеогликанов. Следует отметить, что активность бета-галактозидазы и для самок, и для самцов была примерно одинаковой в незагрязненном отходами ГОКа

оз. Каменном, но во всех органах самцов щук из оз. Окуневого была выше, чем у самок. Активность же данного фермента в хвостохранилище во всех органах (кроме печени) была выше у самок. Выявленные различия свидетельствуют о разной чувствительности самцов и самок к разным по составу техногенным водам (в оз. Окуневом присутствует только минеральная составляющая, а в хвостохранилище присутствуют также остатки горной породы и мелкодисперсная взвесь).

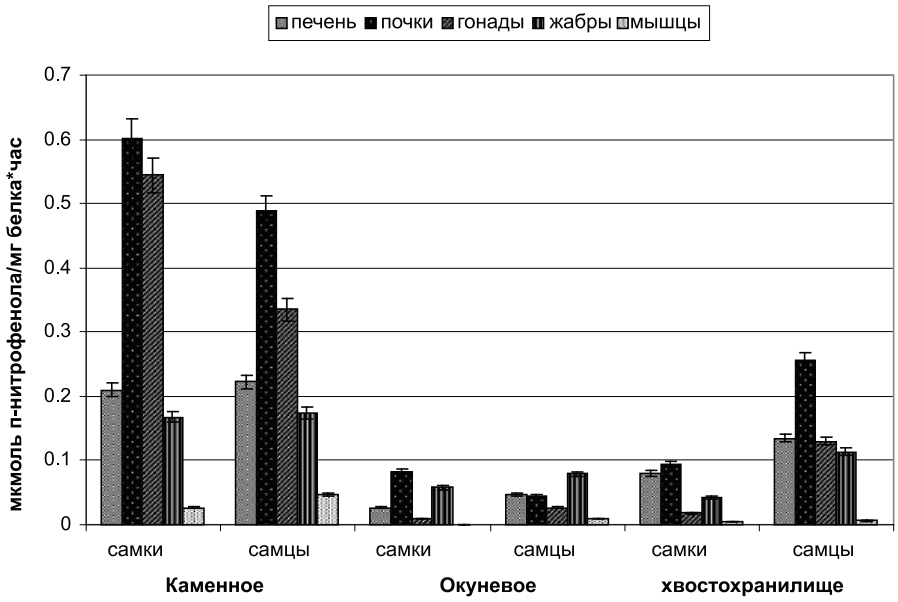

Рис. 1. Сравнительная характеристика активности β-глюкозидазы у щук из водоемов с разным уровнем антропогенной нагрузки

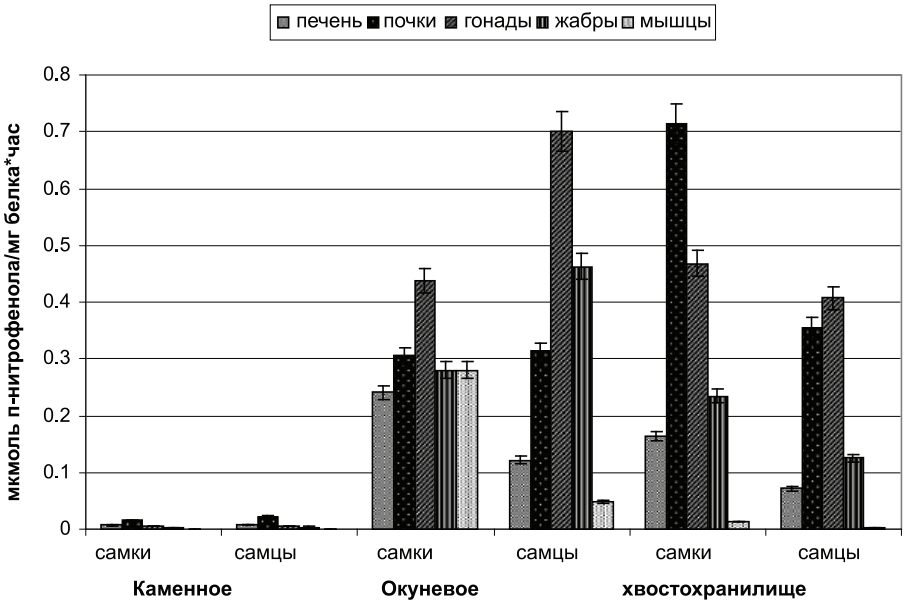

Рис. 2. Сравнительная характеристика активности β-галактозидазы у щук из водоемов с разным уровнем антропогенной нагрузки

Содержание белка было минимальным во всех органах щук, обитающих в оз. Окуневом по сравнению с щуками, обитающими в чистом оз. Каменном и хвостохранилище. Происходило увеличение содержания белка в гонадах, жабрах и мышцах щук, обитающих в хвостохранилище, что возможно связано с усилением процесса синтеза белка, в том числе защитных белков у особей, обитающих в водоеме с наибольшей антропогенной нагрузкой (рис. 3).

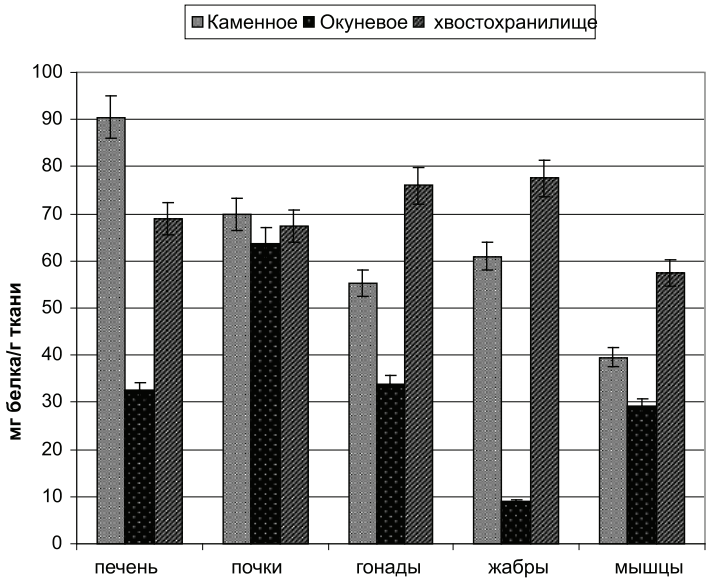

Рис. 3. Сравнительная характеристика содержания белка в органах самок щук из водоемов с разным уровнем антропогенной нагрузки

Полученные данные показывают, что лизосомальные гликозидазы проявляют высокую чувствительность к изменениям в химическом составе среды обитания рыб. Изменения активности отдельных гликозидаз по отношению к загрязнителям зависели от половой принадлежности и уровня загрязнения водоема. У рыб, обитающих в условиях постоянного воздействия поллютантов, формируется более высокий адаптивный потенциал.

Так, у щук, особенностью реакции этих ферментов на данный тип минерального загрязнения является то, что активность глюкозидазы во всех органах в условиях хвостохранилища и оз. Окуневого значительно снижалась, а галактозидазы – резко возрастала по сравнению с рыбами, обитающими в незагрязненном оз. Каменном (Высоцкая и др., 2011). Это говорит о сходном механизме биохимической адаптации у щук, обитающих в данных водоемах. По содержанию белка в органах щук из изучаемых водоемов различия были недостоверными в почках, но во всех других органах щук из оз. Окуневого наблюдалось значительное уменьшение его содержания, что свидетельствует о резком угнетении процессов биосинтеза белка, и особенно в жабрах. У рыб из хвостохранилища не происходило столь заметного изменения уровня содержания белка, по сравнению с особями из оз. Каменного. Возможно, такая реакция объясняется превалированием минеральной составляющей в загрязнении вод в оз. Окуневом по сравнению с хвостохранилищем, в котором присутствуют значительные количества взвеси размолотой горной породы. В этих условиях происходит ухудшение снабжения кислородом отдельных органов, что является причиной перехода на механизмы анаэробного обеспечения энергией, в которых принимают участие лизосомальные гликозидазы.

Таким образом, исследования показали зависимость биохимических реакций щук от половой принадлежности и состава техногенных вод. В оз. Окуневом эти механизмы биохимических адаптаций рыб сходны с теми, что наблюдаются в хвостохранилище КГОКа.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН при поддержке Программы Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» НШ-3731.2010.4 и НШ-1642.2012.4, программ ОБН РАН «Биоресурсы 2009–2011», Президиума РАН «Биоразнообразие 2009–2011», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы» № 28 (подпрограмма 2) 2012–2014 гг, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»(г.к. № 14.740.11.1034), гранта Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8594.

Список литературы

1. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука, 2008. – 284 с.

2. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Вдовиченко Е.А. Лизосомальные гликозидазы в защитных и приспособительных реакциях водных организмов // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III международной конференции. – М.: Изд-во РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. – С. 9–13.

3. Лозовик П.А., Куликова Т.П., Мартынова Н.Н. Мониторинг водных объектов республики Карелия в 1992-2000 гг. // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2003. – С. 135–144.

4. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 216 с.

5. Такшеев С.А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: автореф. дис. … канд. биол. наук. – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2005. – 23 с.

6. A. van der Spoel, E. Bonten, A. d'Azzo. The journal of biological chemistry. – 2000. – Vol. 275. – № 14. – available at http://www.jbc.org/content/275/14/10035.full.pdf+html.

7. Winchester B. Glycobiology. – 2005. – Vol. 15. – № 6. – available at http://glycob.oxfordjournals.org/content/15/6/1R.full.pdf+html.

8. Spiro R. Glycobiology. – 2002. – Vol. 12. – № 4. – available at http://glycob.oxfordjournals.org/content/12/4/43R.full.pdf+html?sid = d634a708-d6bb-46b7-947d-3c6de269358d.

Referenses

1. Vysotskaya R.U., Nemova N.N. Fish lysosomes and lysosomal enzymes / A.S. Konichev, ed., Moscow: Nauka, 2008. 284 p.

2. Vysotskaya R.U., Nemova N.N., Vdovichenko E.A. Lysosomal glycosidases in protective and adaptive reactions of aquatic organisms // Problems of immunology, pathology and fish health protection. Moscow, 2011, pp. 9–13.

3. Lozovik P.A., Kulikova T.P., Martynova N.N. Gidroekologicheskie problemy Karelii I izpolzovanie vodnykh resursov (Hydroecological problems of Carelia and use of water resources), Petrozavodsk, KRC RAS, 2003. 171 p.

4. Nemova N.N., Vysotskaya R.U. Biochemical indication of fish state, Moscow: Nauka, 2004. 215 p.

5. Taksheev S.A. Sostoyanie rybnoi chasti soobschestva Kostomukshskogo khvostokhranilischa i ego otsenka biokhimicheskimi metodami (Condition of Kostomuksha tailing pond fish community and its estimation by biochemical methods), Petrozavodsk, KRC RAS, 23 p.

6. A. van der Spoel, E. Bonten, A. d'Azzo. The journal of biological chemistry, 2000, Vol. 275, no. 14, available at http://www.jbc.org/content/275/14/10035.full.pdf+html.

7. Winchester B. Glycobiology, 2005, Vol. 15, no. 6, available at http://glycob.oxfordjournals.org/content/15/6/1R.full.pdf+html.

8. Spiro R. Glycobiology, 2002, Vol. 12, no. 4, available at http://glycob.oxfordjournals.org/content/12/4/43R.full.pdf+html?sid = d634a708-d6bb-46b7-947d-3c6de269358d.

Рецензенты:

Калинкина Н.М., д.б.н., заведующая лабораторией гидробиологии Института водных проблем Севера Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск;

Илюха В.А., д.б.н., профессор кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии эколого-биологический факультета, ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск.

Работа поступила в редакцию 12.03.2013.