

ВЛИЯНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ ТОКСИКАНТОВ В ПЕЧЕНИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIUS MELANOSTOMUS* АЗОВСКОГО МОРЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДАННОГО ВИДА РЫБ

Карапетьян О.Ш., Павленко Л.Ф., Короткова Л.И., Кораблина И.В., Цема Н.И.

ФГУП «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», Ростов-на-Дону, Россия (344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Береговая, 21В), september1984@gmail.com

Исследованы биохимические и морфометрические показатели бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* прибрежных акваторий Азовского моря. Показана зависимость морфометрических показателей от репродуктивного статуса рыб. Установлено влияние накопления нефтяных углеводородов, хлорорганических пестицидов и тяжелых металлов (кадмия и свинца) в печени на биомаркеры разного уровня данного вида рыб. Выявлено отрицательное влияние нефтяных углеводородов на репродуктивный статус бычка-кругляка. Обнаружено индуцирующее влияние хлорорганических пестицидов на показатели компонентов системы биотрансформации печени. Установлено снижение содержания микросомальных цитохромов при увеличении накопления кадмия в печени рыб. Выявлена положительная связь между увеличением активности глутатион-S-трансферазы и накоплением свинца в печени рыб.

Ключевые слова: биоиндикатор, биомаркер, хлорорганические пестициды, нефтяные углеводороды, тяжелые металлы, соматические индексы, цитохром P450, глутатион-S-трансфераза.

INFLUENCE OF PRIORITY TOXICANT ACCUMULATION IN THE LIVER ON MORPHOMETRIC AND MOLECULAR BIOMARKERS OF ROUND GOBY *NEOGOBIUS MELANOSTOMUS* OF AZOV SEA

Karapetyan O.Sh., Pavlenko L.F., Korotkova L.I., Korablina I.V., Tsema N.I.

FSUE «Azov Scientific-Research Institute of Fish Facilities», Rostov-on-Don, Russia (344002, Rostov-on-Don, Beregovaya st., 21B) september1984@gmail.com

Biochemical and morphometric parameters of round goby of the coastal areas of Azov Sea are investigated. The dependence of morphometric parameters of the reproductive status of fish is shown. The influence of accumulation in the liver of petroleum hydrocarbons, organochlorine pesticides and heavy metals (cadmium and lead) on different level of biomarkers of fish is established. The negative influence of petroleum hydrocarbons on reproduction status of round goby is found. The inducing effect of organochlorine pesticides on the components of biotransformation system of the liver is detected. A reduction of the content of microsomal cytochromes with an increasing level of cadmium accumulation in fish liver is established. A positive relationship between increased activity of glutathione-S-transferase and accumulation of lead in fish liver is indicated.

Keywords: bioindicator, biomarker, organochlorine pesticides, petroleum hydrocarbons, heavy metals, somatic indices, cytochrome P450, glutathione-S-transferase.

Введение

Из приоритетных загрязняющих веществ по критериям экологической опасности (токсичности, генотоксичности, канцерогенности и распространенности) для Азовского моря характерны нефтепродукты, хлорорганические пестициды (ХОП) и ряд тяжелых металлов (ТМ). В результате процессов абсорбции, распределения и биоконцентрации данных соединений происходит их аккумулярование в тканях гидробионтов, сопровождающееся в ряде случаев их специфическим токсическим действием.

В связи с этим в экологическом мониторинге водоемов все большее значение приобретает биоиндикационный подход, основой которого является поиск изменений биологических функций гидробионтов под воздействием всего комплекса приоритетных токсикантов. Малоподвижный придонный образ жизни бычка-кругляка и ряд его морфологических особенностей делают его одним из удобных биоиндикаторных организмов для мониторинга реакции ихтиофауны на загрязнение. Для характеристики состояния вида-биоиндикатора применяются соответствующие биомаркеры – индикаторы разного биологического уровня, которые позволяют оценить отклики организма на действие неблагоприятных для него факторов. В качестве таких маркеров могут быть использованы морфометрические показатели, биохимические характеристики, параметры молекулярных защитных систем [4].

Цель исследования

Оценить влияние накопления приоритетных токсикантов в печени бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* Азовского моря на морфометрические и молекулярные биомаркеры данного вида рыб.

Методы исследования

Работа выполнялась на базе ФГУП «Азовский НИИ рыбного хозяйства», г. Ростов-на-Дону. Объектом исследований служил бычок-кругляк *N. melanostomus*.

Рыб отлавливали летом (июнь) 2011 г. в различных по загрязненности районах Таганрогского залива, Азовского моря и Таманского залива (рис. 1).

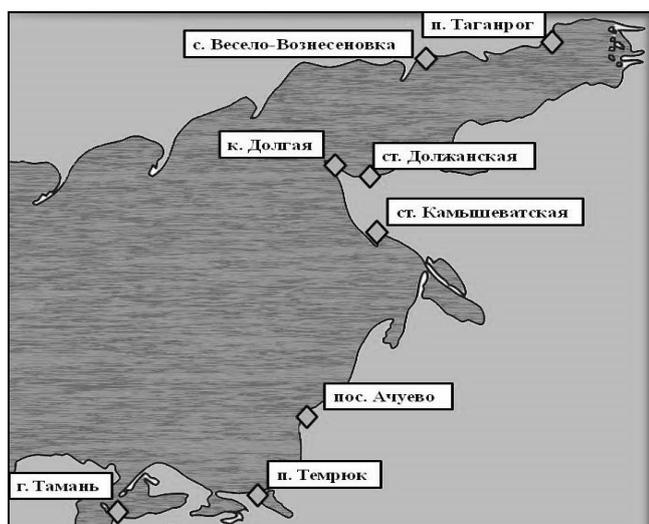


Рисунок 1. Расположение точек отбора материала исследования:

◆ – точка отбора.

На исследование было отобрано 115 самцов и 47 самок с различной стадией зрелости гонад. Каждую особь после отлова измеряли, взвешивали, затем препарировали, извлекая внутренние органы. Стадии зрелости гонад (СЗГ) оценивали визуально по шестибалльной шкале. Величину гепатосоматического индекса (ГПСИ) рассчитывали как отношение массы печени к массе рыбы, выраженное в процентах. Для более точного определения стадии зрелости рыб вычисляли коэффициент зрелости – гонадосоматический индекс (ГСИ) как отношение массы гонад к массе рыбы, выраженное в процентах [5].

Образцы ткани печени каждой рыбы извлекали при вскрытии и замораживали в жидком азоте при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в сосуде Дюара. В печени рыб определяли содержание микросомальных цитохромов b5, P450 и P420 по методу Omura и Sato [7], активность глутатион-S-трансферазы (GST) постмитохондриальной фракции (фракция S9) по методике Sen и Kirikbakan при $\lambda=340\text{ нм}$ [8], содержание белка – методом Bradford [6].

Определение содержания хлорорганических пестицидов в печени рыб проводили методом газожидкостной хроматографии [2]. Оценка накопления ХОП в печени рыб дана по сумме наиболее распространенных стойких хлорорганических пестицидов: изомеров ГХЦГ (α -, γ -, β -) и метаболитов и изомеров ДДТ (n,n'-ДДЕ, o,n-ДДЕ, n,n'-ДДД, o,n-ДДД, n,n'-ДДТ, o,n-ДДТ).

Определение содержания нефтяных углеводородов (НУ) проводили люминесцентным методом [1].

Определение содержания приоритетных металлов в печени рыб проводили методом атомной абсорбции с электротермической атомизацией [3].

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя стандартный пакет программ MS Office Excel 2007 и Statistica 8. Достоверность различий между выборками оценивали по U-критерию Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$. С целью выявления зависимости между исследованными параметрами рассчитывали коэффициент корреляции Спирмана (r_s).

Результаты и обсуждение

Результаты химического анализа не выявили превышения принятых нормативов по содержанию хлорорганических пестицидов и тяжелых металлов – кадмия и свинца в печени рыб разных районов исследования (таблица 1).

Таблица 1 – Средние концентрации приоритетных токсикантов в печени бычка-кругляка прибрежных районов Азовского моря в 2011 г.

Место отбора	ХОП, мкг/кг	НУ, мг/кг	Pb, мг/кг	Cd, мг/кг
с. Весело-Вознесеновка	361	4	0,34	0,011
г. Таганрог, порт	965	6	0,32	0,008
ст. Должанская	328	10	0,05	0,014
к. Долгая	166	9	0,14	0,011
ст. Камышеватская	57	4	0,07	0,005
пос. Ачуево	147	106	0,06	<0,005
г. Темрюк, порт	279	16	0,08	0,005
г. Тамань	110	23	0,05	0,054
Допустимый уровень	3000	не уст.	1	0,7

Максимальная концентрация хлорорганических пестицидов была обнаружена в печени бычков Таганрогского порта. Аномально высокая концентрация нефтяных углеводов – 106 мг/кг сырой массы была зарегистрирована в печени бычков, выловленных в районе пос. Ачуево. Следует отметить, что печень этих рыб была некротизирована. Максимальное содержание Pb отмечалось в печени бычков с. Весело-Вознесеновка и Таганрогского порта, содержание Cd было высоким в печени рыб Таманского залива.

Для оценки биологического ответа популяции бычка-кругляка на хроническое воздействие малых концентраций исследуемых токсикантов исследовались биомаркеры разного уровня.

Анализ морфометрических биомаркеров выявил зависимость их величины от стадии зрелости рыб. Так, среднее значение гепатосоматического индекса самцов II стадии зрелости, отловленных в районе с. Весело-Вознесеновка, составляло $6,75 \pm 0,21\%$ и на 28% превышало значение данного показателя у самцов IV стадии зрелости данного района. У самок также с увеличением стадии зрелости происходило снижение ГПСИ. Средние значения гепатосоматического индекса самок IV–V стадии зрелости Таманского залива были минимальными и составляли $2,02 \pm 0,14\%$. Как правило, в период нереста происходит снижение ГПСИ из-за расходования энергетических запасов печени на созревание половых продуктов [10].

Гонадосоматические индексы возрастали по мере увеличения степени зрелости рыбы. Наиболее высокие значения ГСИ обнаруживались у самок IV–V стадии зрелости Таманского залива ($18,2 \pm 0,59\%$). Среднее значение гонадосоматического индекса самцов III–IV стадии зрелости пос. Ачуево достоверно было ниже величин данного показателя у рыб других районов с различным репродуктивным статусом. В районе с. Весело-Вознесеновка, пос. Ачуево и Темрюкского порта в уловах встречались особи с незрелыми половыми

продуктами II стадии зрелости. Присутствие незрелых особей в нерестовом стаде может свидетельствовать о недостаточности питания в преднерестовое время или о влиянии ряда других неблагоприятных факторов.

Несмотря на значительную зависимость величины морфометрических показателей рыб от репродуктивного статуса, нами были выявлены отрицательные корреляционные связи данных показателей с концентрациями НУ в печени рыб. Так, наблюдалась отрицательная корреляция гепатосоматического индекса с накоплением нефтяных углеводов в печени рыб ($r_s = -0,62$, $p < 0,05$). Уменьшение ГПСИ при увеличении накопления нефтяных углеводов в организме рыб, с одной стороны, может свидетельствовать о потерях гликогена печени при расходовании его в качестве источника энергии для выведения ксенобиотиков из организма. С другой стороны, снижение ГПСИ может быть связано с гистопатологическими изменениями в печени, включающими разрушение и дегенерацию гепатоцитов [9].

Учитывая тот факт, что снижение гепатосоматического индекса и нарушение функций печени под влиянием персистентных ксенобиотиков может напрямую приводить к нарушениям репродуктивных функций рыб, можно предположить, что присутствие незрелых особей и низкие значения гонадосоматического индекса у рыб, отловленных в пос. Ачуево, связаны с негативным влиянием накопления нефтяных углеводов в печени.

Результаты биохимических исследований выявили различия в содержании микросомальных цитохромов и активности глутатион-S-трансферазы печени бычка-кругляка различных районов исследования (таблица 2).

Таблица 2 – Средние значения молекулярных биомаркеров системы биотрансформации в печени бычка-кругляка прибрежных зон Азовского моря

Район отлова	b5, нМоль/мг белка микросом	P450, нМоль/мг белка микросом	P450+P420, нМоль/мг белка микросом	GST, мкмоль/мг белка фракции S9*мин.
с. Весело-Вознесенка	0,19±0,02	0,43±0,05	1,22±0,13	2,19±0,34
г. Таганрог, порт	0,18±0,02	0,48±0,08	1,45±0,18	4,98±0,42
ст. Должанская	0,15±0,01	0,33±0,02	1,29±0,09	3,74±0,37
к. Долгая	0,07±0,01	0,2±0,01	0,83±0,06	4,38±0,66
ст. Камышеватская	0,25±0,04	0,44±0,03	1,53±0,06	2,14±0,36
пос. Ачуево	0,36±0,12	0,41±0,07	1,38±0,25	2,95±0,37
г. Темрюк, порт	0,23±0,04	0,46±0,06	1,46±0,18	3,25±0,22

г. Тамань	0,08±0,01	0,18±0,02	0,78±0,06	2,75±0,19
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Содержание цитохрома b5 варьировало в пределах от 0,07 нМоль/мг белка микросом (к. Долгая) до 0,36 нМоль/мг белка микросом (п. Ачуево). Более высокий уровень цитохрома b5 в пос. Ачуево может быть связан с аномально высоким уровнем НУ в печени бычков, выловленных в этом районе. Имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что уровень цитохрома b5 возрастает в печени некоторых видов рыб, подвергшихся воздействию сырой нефти [9].

Содержание микросомальных цитохромов в печени бычков к. Долгой и Таманского залива было достоверно ниже данных показателей у рыб других районов исследования. Суммарные количества цитохромов P450 и P420 в пяти точках отбора (с. Весело-Вознесенка, п. Таганрог, ст. Должанская, п. Ачуево, п. Темрюк) достоверно не отличались друг от друга.

Средние значения активности GST варьировали в пределах от 2,14 мкМоль/мг белка фракции S9*мин. (п. Ачуево) до 4,98 мкМоль/мг белка фракции S9*мин. (Таганрогский порт). В акваториях у побережья ст. Должанской, ст. Камышеватской и Темрюкского морского порта показатели активности GST в печени рыб достоверно не отличались друг от друга. Достоверных различий не было обнаружено и среди показателей бычков, отловленных в районах с. Весело-Вознесенка, п. Ачуево и г. Тамани. Наибольшие значения активности GST были в печени бычков Таганрогского порта.

Результаты корреляционного анализа выявили влияние накопления приоритетных токсикантов на уровень молекулярных биомаркеров в печени бычка-кругляка.

Так, было показано, что содержание цитохрома P450 ($r_s=0,72$, $p<0,05$) и активность глутатион-S-трансферазы ($r_s=0,81$, $p<0,05$) положительно коррелируют с уровнем ХОП в печени самцов. Происходит увеличение содержания и активность ферментов биотрансформации печени у разных видов рыб в ответ на воздействие ХОП. Через взаимодействие со специфическими внутриклеточными рецепторами хлорорганические пестициды способны значительно увеличивать индукцию генов ферментов биотрансформации [9].

При анализе корреляционных связей с тяжелыми металлами была обнаружена сильная отрицательная зависимость между компонентами микросомальной гидроксидирующей системы и концентрацией Cd в печени бычков (таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции между концентрацией кадмия и молекулярными биомаркерами в печени рыб ($p<0,05$)

Показатель	b5	P450	P450+P420
Cd в печени	-0,78	-0,76	-0,88

Вероятно, низкие значения микросомальных цитохромов в печени бычков Таманского залива связаны именно с негативным влиянием кадмия, так как в печени рыб этого района были найдены существенные концентрации данного металла. Согласно данным литературы, тяжелые металлы способны нарушать процессы синтеза различных микросомальных цитохромов. Также было показано, что кадмий является специфическим ингибитором различных изоформ цитохрома P450 [9].

В процессе обработки данных была обнаружена положительная связь активности GST с уровнем свинца ($r_s=0,62$, $p<0.05$) в печени самцов бычка-кругляка.

Высокая активность GST в печени самцов Таганрогского порта наблюдалась на фоне высоких концентраций свинца и ХОП. Повышение активности GST в ответ на действие данных токсикантов может свидетельствовать о том, что организм бычка-кругляка адаптируется к обитанию в загрязненной среде. Адаптация достигается за счет более высокой активности ферментных систем, которые выводят вредные вещества из тканей и нейтрализуют неблагоприятные эффекты, вызванные их воздействием.

Заключение

Таким образом, использование данных химического анализа печени вместе с показателями биомаркеров различного уровня бычка-кругляка позволило нам оценить биологический ответ гидробионтов на влияние комплекса приоритетных токсикантов. Использование морфометрических показателей в качестве биомаркеров загрязнения показало негативное влияние накопления нефтяных углеводородов в печени на репродуктивный потенциал рыб в районе пос. Ачуево.

Анализ молекулярных биомаркеров печени с данными химического анализа выявил индуцирующее влияние ХОП и свинца на активность глутатион-S-трансферазы самцов бычка-кругляка, отловленных в районе Таганрогского порта. Было обнаружено ингибирующее воздействие кадмия на ферменты микросомальной системы в печени рыб Таманского залива.

Список литературы

1. МВИ массовой доли нефтяных углеводородов в пробах гидробионтов пресных и морских водных объектах. Люминесцентный метод : Регистрационный код МВИ по Федеральному реестру: ФР.1.31.2009.06562.

2. МВИ массовых долей хлорорганических пестицидов в пробах биологического материала пресных и морских водных объектов методом газожидкостной хроматографии : Регистрационный код МВИ по Федеральному реестру: ФР.1.31.2008.04701.

3. МВИ массовых долей кадмия, меди, свинца и цинка в пробах гидробионтов методом атомной абсорбции с электротермической атомизацией : Регистрационный код по Федеральному реестру: ФР.1.31.2007.04014.

4. Руднева И.П. [и др.] Комплексная оценка качества водной среды с помощью биомаркеров разного уровня // Актуальные проблемы водной токсикологии. – Борок : ИБВВ, 2004. – С. 124–150.

5. Шевелев М.С. Инструкции и методические рекомендации по сбору и обработке биологической информации в районах исследований ПИНРО. – Мурманск : Изд-во ПИНРО, 2001. – 291 с.

6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.

7. Omura A.T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. Solubilization, purification and properties // J. Biol. Chem. – 1964. – V. 239. – № 7. – P. 2379–2385.

8. Sen A., Kirikbakan A. Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*) // Biochemistry. – 2004. – V. 69. – № 9. – P. 1322–1336.

9. Van der Oost R.V., Beyer J., Vermeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2003. – V. 13. – P. 57–149.

10. Wallace R., Selman K. Physiological aspects of oogenesis in two species sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L. and *Apeltes quadracus* (Mitchill) // Journal of Fish Biology. – 1979. – V. 14. – P. 551–564.

Рецензенты:

Корпакова И.Г., д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГУП «Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», г. Ростов-на-Дону.

Внуков В.В., д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой биохимии и микробиологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону.