

17. Prasad M.S. SEM study on the effects of crude oil on the gills and airbreathing organs of climbing perch *Anabas testudineus* // Bulletin of Environmental Contamination Toxicology. – 1991. – V. 47(6). – P. 882-889.
18. Salamat N., Zarie M. Using of fish Pathological alterations to assess pollution: a review // World journal of fish and marine sciences. – 2011. V. 4(3). – P. 223-231.
19. Santos T., Gomes V., Passos J., Rocha A., Salaroli R., Ngan P. Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene // Pan-American Journal of Aquatic Sciences. – 2011. V. 6(2). – P. 109-120.
20. Schwaiger J, Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. The use of histopathological indicators to evaluate conminantrelated stress in fish // Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery. – 1997. V. 6. – P. 75-86.
21. Wilson J.M., Laurent P. Fish gill morphology: inside out // Journal of experimental zoology. – 2002. V. 293. – P. 192-213.

УДК 577.151.05+ 575.857

*Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Дроганова Т.С., Коничев А.С.
Московский государственный областной университет*

КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА КАК БИОХИМИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МОЛЛЮСКОВ

*I. Tsvetkov, L. Polykarpova, T. Droganova, A. Konichev
Moscow Regional State University*

MICHAELIS CONSTANT AS A BIOCHEMICAL CRITERION OF INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF RIVER SNAILS

Аннотация. Исследован характер изменчивости константы Михаэлиса (K_m) кислой фосфатазы и ДНКазы у пресноводного моллюска живородки речной (*Viviparus viviparus* L.), собранного в естественных водоемах Московской области. Эта изменчивость была использована нами в качестве маркера дифференциации при анализе причин межпопуляционного полиморфизма моллюсков. Кластерный анализ позволил верифицировать избранный дифференциатор и предположить, что он указывает не столько на территориальную удаленность популяций и возможность их взаимопроникновения, сколько на зависимость от условий обитания в соответствующих водоемах. Показано, что обитание моллюсков в сходных условиях приводит к увеличению степени сходства K_m даже у полностью изолированных популяций.

Ключевые слова: кислая фосфатаза, дезоксирибонуклеаза, константа Михаэлиса, внутривидовой полиморфизм, пресноводный моллюск.

Abstract. We studied the character of the Michaelis constant (K_M) variability of acid phosphatase and DNase in river snails (*Viviparus viviparus* L.) collected in the natural waters of the Moscow region. This variability was used as a differentiation marker in order to analyze the reasons of interpopulation polymorphism in this molluscan family. Cluster analysis allowed us to verify the chosen differentiator and to assume that it refers not only to the territorial remoteness of populations and the possibility of their interpenetration but also to their dependence on the environmental conditions in the corresponding reservoirs. It was shown that the degree of K_M similarity increases among completely isolated populations living in similar conditions.

Key words: acid phosphatase, deoxyribonuclease, Michaelis constant, intraspecific polymorphism, freshwater snail.

Биохимические параметры гидробионтов уже давно применяются для описания патологических изменений в организме вследствие неблагоприятных воздействий среды. Среди этих параметров качественный состав белков, липидов, полисахаридов, количество РНК, концентрация определенных ключевых метаболитов, но ведущую позицию в характеристике метаболизма заслуженно занимают ферменты. Активность и множественные формы различных ферментов считаются важнейшими диагностическими признаками для выявления системных заболеваний в медицине и ветеринарии, а также служат маркерами стресс-реакции животных при токсическом воздействии на них [5]. Однако аналогичным образом выявить и интерпретировать реакцию в природных популяциях практически невозможно. Само существование статистически достоверной нормы для биохимического маркера, в частности активности определенных ферментов в популяциях, может быть сомнительным, не говоря уже о выявлении отклонений от этой нормы вследствие изменений условий обитания.

Решение этой проблемы заключается в использовании совершенно иных биохимических параметров, более относящихся к генетически обусловленной структуре фермента, чем к особенностям его функционирования в различных условиях среды, а следовательно, характеризующего не столько стресс-реакцию организма, сколько историю существования популяции в новых или постоянно меняющихся условиях обитания. Традиционно относятся к таковым, в первую очередь, наборы множественных форм ферментов (в том числе изозимов и аллозимов, отражающих определенное сочетание генов и их аллелей). Но последние, чаще всего, высоко консервативны, по крайней мере, у близко расположенных популяций и тем более внутри отдельной популяции.

На основании результатов проведенных нами исследований мы предлагаем новый критерий внутривидовой дифференциации, отражающий реакцию на условия обитания, а именно константу Михаэлиса (K_m), кото-

рая позволяет с высоким разрешением изучать индивидуальную изменчивость внутри популяций и межпопуляционный полиморфизм в природных экосистемах [3; 4]. Изучение процесса возникновения изменчивости на биохимическом уровне и ее направленности в связи с определенными условиями обитания является целью данной работы.

Материалы и методы

Материалом служили моллюски живородки речной (*Viviparus viviparus* L.), которые собирались в различных водоемах Московской области в июле-августе 2011 г. Станции сбора располагались на правом берегу реки Вязь (Пушкинский р-он, с. Тишково, станция № 1), на правом берегу реки Мжуть (Можайский р-он, пос. Колычево, станция № 2), в ручье возле лесного массива на окраине дачного посёлка севернее Фрязино (станция № 3) и по берегам искусственной запруды на реке Любосеевка (ст. «Фрязино-Пассажи́рская» Ярославской ж/д, станция № 4).

Группу особей, собранных в одном месте, препарировали индивидуально. Из пищеварительной железы каждого моллюска получали экстракт водорастворимых белков путем гомогенизации с 10-кратным объемом 0,15М NaCl и последующим центрифугированием при 10000 g и 4°C для освобождения от клеточного дэбриса. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли методом Лоури [9], активность кислой фосфатазы (КФ) – спектрофотометрически с *p*-нитрофенилфосфатом в качестве субстрата в 50 мМ ацетатном буфере (оптимальный pH 4,0) [8], активность дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) – самостоятельно разработанным методом с флюоресцентно-меченым олиго-дцДНК в качестве субстрата в 50 мМ ацетатном буфере (оптимальный pH 4,2) [6].

K_m ферментов определяли с серией растворов субстрата концентрацией от 0,01 мМ до 2 мМ для КФ и от 0,1 до 4 мкМ для ДНКазы. Установленную таким образом зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата линейризовали по

методу Лайнуивера-Берка (с использованием MS Excel). Это преобразование позволяет наиболее точно установить величины максимальной скорости реакции и K_m [1].

Характер внутривидовой (межпопуляционной) дифференциации моллюсков выявляли с помощью метода кластерного анализа (с использованием Statistica 6.0), используя для этого значения K_m ферментов, полученные во всех повторных измерениях для всех проанализированных особей вне зависимости от принадлежности к определенной выборке.

Результаты и обсуждение

Активность ферментов живородки различается у отдельных особей столь значительно, что использовать этот биохимический параметр непосредственно в качестве дифференциатора оказалось невозможно. В тоже время величины K_m для тех же особей оказались более однородными внутри выборок, а между выборками достоверно отличались друг от друга (см. табл.). Эти отличия и были нами использованы для количественной характеристики сходства особей моллюсков, собранных на разных станциях сбора материала (см. рис.).

Важно отметить, что объединение определенных вариаций в кластеры, которое совпадает с выборками особей из популяций на соответствующих станциях сбора моллюсков (по 6 шт. с каждой), т. е. данными *a priori*, объективно указывает на правомерность приме-

ненного нами метода оценки генетической близости и адекватность использованного биохимического критерия. Действительно, особи с 1 по 6 (Var 1–Var 6), собранные на станции 1, формируют свой кластер на дендрограмме, а особи с 7 по 12 (Var 7–Var 12), собранные на станции 2, – другой. Генетическая близость особей внутри одной популяции очевидна и не требует доказательств, однако, что наиболее важно в нашем случае, она дает возможность верифицировать статистический метод и биохимический критерий, примененный нами для ее оценки.

В тоже время взаимоотношения между кластерами – группами особей из отдельных популяций, характер их дифференциации на дендрограмме требует дополнительного обсуждения. В частности, наиболее интересны причины генетической близости особей, собранных на станциях 1 и 4 (реки Вязь и Любосеевка, соответственно), весьма удаленных друг от друга географически и не имеющих единого водотока, по которому могли бы мигрировать моллюски. Кроме того, полиморфизм особей по величинам K_m КФ и ДНКазы в обоих водоемах сравнительно низок – отдельные особи практически не отличаются между собой (Var. 1, 3 и 5, Var. 2 и 4, Var. 19, 20, 23 и 24 – см. рис. 2), что должно указывать на последствия прохождения популяции через «бутылочное горло» естественного отбора (а именно стабилизирующего отбора) и может свидетельствовать о вероятном неблагоприятии существования живородки в этих водоемах. Это предположение не исключает

Таблица

Статистические данные о K_m ферментов живородки речной

Станция сбора	Кислая фосфатаза			ДНКазы		
	K_m , 10^{-3} М	Средняя ошибка $\pm m$	Коэфф. Стьюдента t	K_m , 10^{-6} М	Средняя ошибка $\pm m$	Коэфф. Стьюдента t
1	0,092	0,001	67,439	0,428	0,008	87,391
2	0,519	0,011	48,004	0,973	0,039	64,105
3	0,203	0,003	71,321	0,683	0,016	84,201
4	0,074	0,001	121,639	0,380	0,006	52,348
Результаты достоверны с вероятностью $p \geq 0,99$ ($t_{st} = 2,807$)						

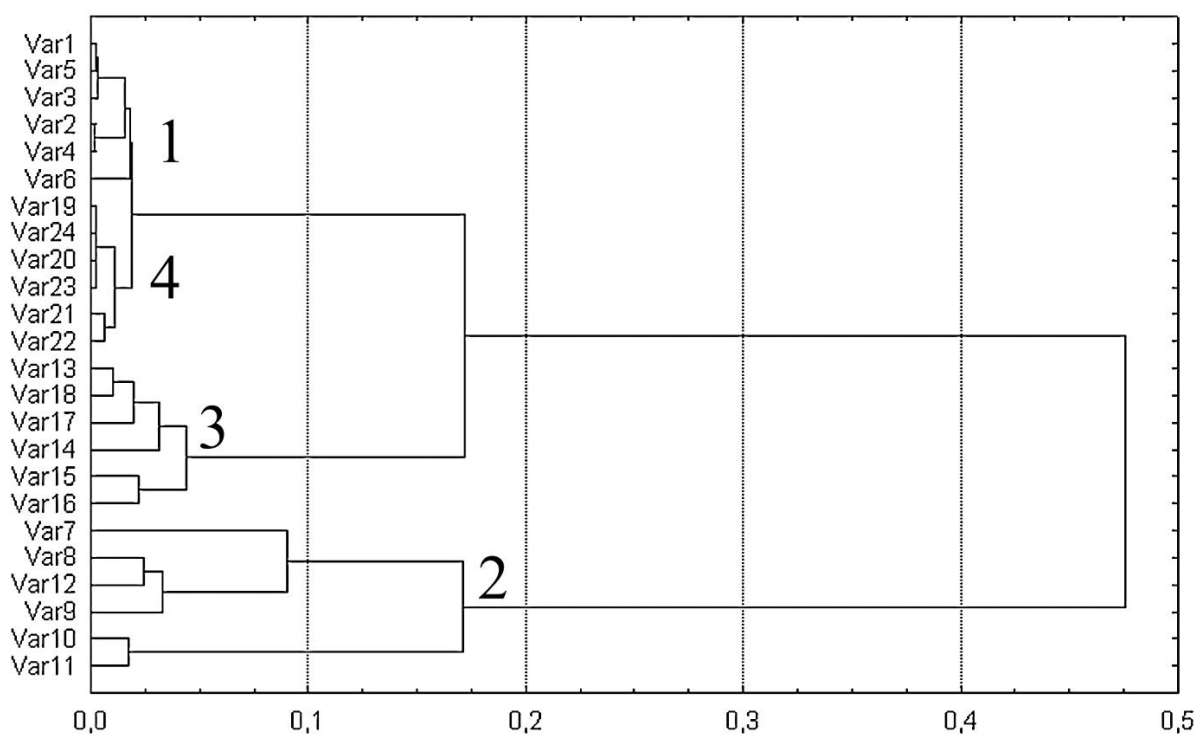


Рис. Дендрограмма распределения особей живородки речной (Var 1–Var 24), собранных на четырех разных станциях (1–4).

По горизонтали – евклидово расстояние между кластерами

высокой генетической изменчивости в рассматриваемых популяциях. Как известно, стабилизирующий отбор как раз и является механизмом накопления изменчивости в природных популяциях, однако фенотипически, судя по биохимическому критерию полиморфизма, популяции на станциях 1 и 4 остаются однородными, по крайней мере, в момент их наблюдения.

Анализ дифференциации других кластеров указывает на прямо противоположные явления. Кластеры 2 и 3 сильно удалены от остальных и друг от друга, одновременно внутри них обнаруживается гораздо больше различий между отдельными вариантами (особями), что указывает на высокий полиморфизм и явно выраженный процесс межпопуляционной дифференциации живородки, обитающей в реке Мжуть (станция 2) и безымянном ручье на окраине г. Фрязино (станция 3). В этих водоемах условия обитания моллюсков совершенно иные, от-

личные друг от друга и от рек Вязь и Любосеевка. Даже относительная географическая близость станций 3 и 4 (г. Фрязино) мало отразилась на характере объединения в группы собранных на этих станциях особей и близости их между собой. Особенно заметно отличается от других станция 2, внутри которой степень различий между отдельными особями превышает таковую для целых групп (см. рис. 1). Причиной тому может служить непостоянство условий обитания моллюсков, что вполне характерно для небольших водоемов с малой «буферной емкостью» в отношении, например, химических загрязнителей или перепадов температуры, а также наличия и качества кормовой базы. Ввиду таких особенностей в популяциях моллюсков, вынужденных приспосабливаться к действию всевозможных факторов среды из-за постоянной привязанности к очень узкой акватории, появляются различные внутривидовые формы, которые отличаются своими био-

химическими стратегиями адаптации, а следовательно, метаболическим статусом и его параметрами, в том числе структурно-функциональными характеристиками ферментов [7]. Такие эволюционные изменения можно рассматривать как начальные признаки дизруптивного отбора – процесса, благоприятствующего двум или нескольким крайним вариантам изменчивости, но препятствующего существованию промежуточного, усредненного состояния признака [2].

Заключение

Установленный нами факт внутривидовой дифференциации моллюсков по биохимическому параметру – константе Михаэлиса (K_m) и ДНКазы (характеризующий постоянство или переменчивость условий обитания и практически не связанный с экспансией вида на смежные акватории) подтверждает гипотезу о возможности исследовать микроэволюционные процессы с использованием биохимических маркеров-дифференциаторов. Данный метод пока не может непосредственно использоваться для характеристики и мониторинга качества среды обитания моллюсков, так как необходимы дальнейшие исследования с применением молекулярно-генетических дифференциаторов и анализ внутривидовой изменчивости в связи с воздействием на биоту каких-либо загрязняющих веществ или иных неблагоприятных факторов. Однако сам подход к такого рода исследованиям уже продемонстрирован выше и может послужить базой для планирования экспериментальной работы по изучению механизмов адаптивной изменчивости и видообразования в природных гидробиоценозах в условиях все возрастающей техногенной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. – М.: Высшая школа, 1977. – 280 с.
2. Константинов А.В. Основы эволюционной теории: учебное пособие для вузов / 2-е изд., испр. – Минск : Вышэйшая школа, 1979. – 400 с.
3. Поликарпова Л.В., Цветков И.Л., Коничев А.С. Константа Михаэлиса кислой фосфатазы, как критерий антропогенного влияния на внутривидовую дифференциацию леща (*Abramis brama*) в Рыбинском водохранилище // Мат. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посв. памяти Б.А. Флерова: «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» (Борок, 24-29 сентября 2011 г.). – Ч. 1. – Борок: Изд-во ИБВВ им. И.Д. Папанина, 2011. – С. 203-207.
4. Поликарпова Л.В. Константа Михаэлиса кислой фосфатазы как критерий внутривидовой дифференциации гидробионтов открытых водоемов Московской области // Сб. науч. тр. Междунар. заоч. науч.-практ. конф.: «Наука сегодня: теоретические аспекты и практика применения» (Тамбов, 28 октября 2011 г.). – С. 98-100.
5. Цветков И.Л., Коничев А.С. Экологическая биохимия гидробионтов. – М.: Изд-во МГОУ, 2006. – 104 с.
6. Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Коничев А.С. Новый метод количественного определения активности дезоксирибонуклеазы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов в качестве субстрата // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». – 2012. – № 3. – С. 46-51.
7. Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации / пер. с англ. – М.: Мир, 1977. – 398 с.
8. Heinonen J.K., Lahti R.A. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. – 1981. – Vol. 113. – № 2. – P. 313-317.
9. Lowry O.H., Rosenbrought N.J., Farr A.L., Rangel R.L. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – № 2. – P. 265-275.