

УДК 577.15.

Поликарпова Л.В.

Московский государственный областной университет

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И НУКЛЕАЗ В ПЕЧЕНИ И ЖАБРАХ ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA*)

L. Polikarpova

Moscow State Regional University

SEASONAL DYNAMICS OF ACID PHOSPHATASE AND NUCLEASES ACTIVITY IN LIVER AND BRANCHIAE OF BREAM (*ABRAMIS BRAMA*)

Аннотация. Исследована сезонная динамика активности кислой фосфатазы, кислой ДНКазы и кислой РНКазы в печени и жабрах лещей, выловленных в Рыбинском водохранилище. Динамика активности всех изученных ферментов имеет сходный характер и отражает интенсивность обмена веществ в различные периоды жизнедеятельности рыб. Установлена взаимосвязь между уровнем удельной активности исследованных ферментов и периодами размножения (нереста) и интенсивного питания (нагула) рыб. Обсуждаются возможности использования полученных данных для мониторинга физиологического состояния рыб.

Ключевые слова: лещ, ферменты, динамика активности, сезоны, физиологическое состояние, мониторинг.

Abstract. The paper is concerned with seasonal dynamics of acid phosphatase, acid DNase and acid RNase activity in liver and gills of the bream inhabiting the Rybinsk reservoir. The seasonal activity dynamics appears to be similar for all studied enzymes and shows the intensity of fish metabolism in different time of their life. We have revealed a distinct correlation between the level specific activity of the enzymes and reproductive periods (spawning) and intensive periods of fish feeding. We have discuss a possible use of the collected data to monitor physiological conditions of fish.

Key words: bream, proteins, activity dynamics, seasons, physiological condition, monitoring.

Актуальной задачей современной экологической биохимии гидробионтов является анализ биохимических процессов, обеспечивающих нормальное существование и адаптационные возможности различных организмов в изменяющихся условиях среды [9]. Одновременно такие исследования существенны для создания комплексной системы мониторинга пригодности различных сред обитания, включая водные экосистемы. Отсюда, в частности, возникает необходимость оценки состояния популяций рыб и особенно их хозяйственно ценных видов, что обуславливает поиск биохимических показателей, служащих индикаторами физиологического состояния в различные периоды годового цикла при изменяющихся условиях обитания [10; 11]. В связи с этим несомненный интерес представляет изучение сезонных изменений активности ферментов в тканях и органах рыб. Перспективность использования ферментов для оценки влияния среды обитания на обменные процессы у различных видов пресноводных гидробионтов была ранее продемонстрирована в целом ряде исследований [4; 5, 518-523]. В тоже время, эти работы были связаны, преимущественно, с анализом изменения активности тех или иных ферментов в условиях токсического воздействия и не учитывали нормальных сезонных изменений их активности.

© Поликарпова Л.В.

Автор выражает глубокую признательность зав. лабораторией физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН (Борок), д.б.н. Г.М.Чуйко за предоставленный биологический материал, а также к.б.н. Попову А.П. и д.б.н. Коничеву А.С. за помощь в обсуждении полученных данных.

Следует отметить, что выбор конкретных ферментов-индикаторов имеет большое значение для интегрированной оценки интенсивности метаболических процессов, детерминирующего физиологическое состояние организма. Одновременно, учитывая задачи мониторинга, предпочтение, очевидно, должно быть отдано ферментам, способным сохранять активность в условиях неизбежного периода хранения образцов тканей и органов, собранных в природных условиях, а также доступных с точки зрения простого, точного и быстрого определения их активности.

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы стало выявление сезонных изменений активности кислых гидролаз (кислой фосфатазы КФ, кислой ДНКазы и кислой РНКазы) в печени и жабрах леща, которые могут служить индикаторами физиологического состояния этого широко распространенного и имеющего важное промысловое значение вида рыб. Известно, что нуклеазы с максимальной активностью при кислых значениях pH локализованы, преимущественно, в лизосомах, где наряду с другими кислыми гидролазами осуществляют катаболические реакции, лежащие в основе важнейших физиологических и биохимических процессов [7; 8, 85-95]. КФ относится к числу ферментов широко представленных в разных субклеточных формах, обладающих широкой субстратной специфичностью, и расщепляет разнообразные фосфомоноэфиры различных органических соединений биологической природы, участвуя в обмене углеводов, липидов и энергетическом обмене. Поэтому уровень активности избранных для исследования ферментов может, в определенной мере, служить показателем интенсивности метаболизма в целом. Как показали наши предварительные эксперименты, активность этих ферментов хорошо сохраняется в замороженных образцах ткани рыб в течение нескольких месяцев.

Материалом для исследования служили экстракты водорастворимых белков печени и жабр лещей, выловленных траловым методом в районе Шумаровых островов Рыбинского водохранилища в течение девяти месяцев нормального с точки зрения климатических

факторов сезона 2009 г. Ткани извлекали из половозрелых особей рыб, и белки из замороженных индивидуальных образцов тканей экстрагировали пятикратным по отношению к навеске (W/V) количеством 0,15 М раствора NaCl при 0-2 °С в течение 20 мин. Экстракты центрифугировали при 6000 gв течение 30 мин. при 4 °С и полученные супернатанты использовали для определения активности ферментов.

Активность КФ определяли спектрофотометрическим методом по скорости гидролиза модельного субстрата – р-нитрофенилфосфата [6, 1161-1167]. За единицу активности (Е) фермента принимали такое его количество, которое вызывает увеличение оптической плотности при 415 нм на 1 единицу (при инкубации 20 мин. при 37 °С в 0,05М ацетатном буфере с pH 4,8). Активность ДНКазы и РНКазы определяли спектрофотометрическим методом по приросту продуктов деградации ДНК и РНК соответственно [5, 518-523], в качестве субстратов использовали препараты высокополимерной ДНК из тимуса телят («Sigma», США) и РНК из пекарских дрожжей («Sigma», США). Активность нуклеаз определяли при предварительно установленных нами оптимальных значениях pH инкубационной среды (0,05М ацетатный буфер): для ДНКазы – pH 5,2, для РНКазы – pH 5,6. За единицу активности (Е) принимали такое количество фермента, которое вызывало увеличение оптической плотности при 260 нм на 1 единицу после 1ч. инкубации при 37 °С. Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах активности на 1мг белка (Е/мг белка), определенного по методу Лоури. Статистическую достоверность результатов рассчитывали по методу Стьюдента для вероятности $p \geq 0,95$.

Судя по полученным результатам, активность КФ в печени выше, чем в жабрах леща, тогда как активность кислой РНКазы, напротив, выше в жабрах рыб. Полученные данные свидетельствуют о ярко выраженных достоверных изменениях активности исследованных ферментов в жабрах и печени лещей в течение проанализированного сезона. Эти изменения носят сходный характер в тканях и отчетливо приурочены к определенным

физиологическим периодам существования рыб (см. рис.).

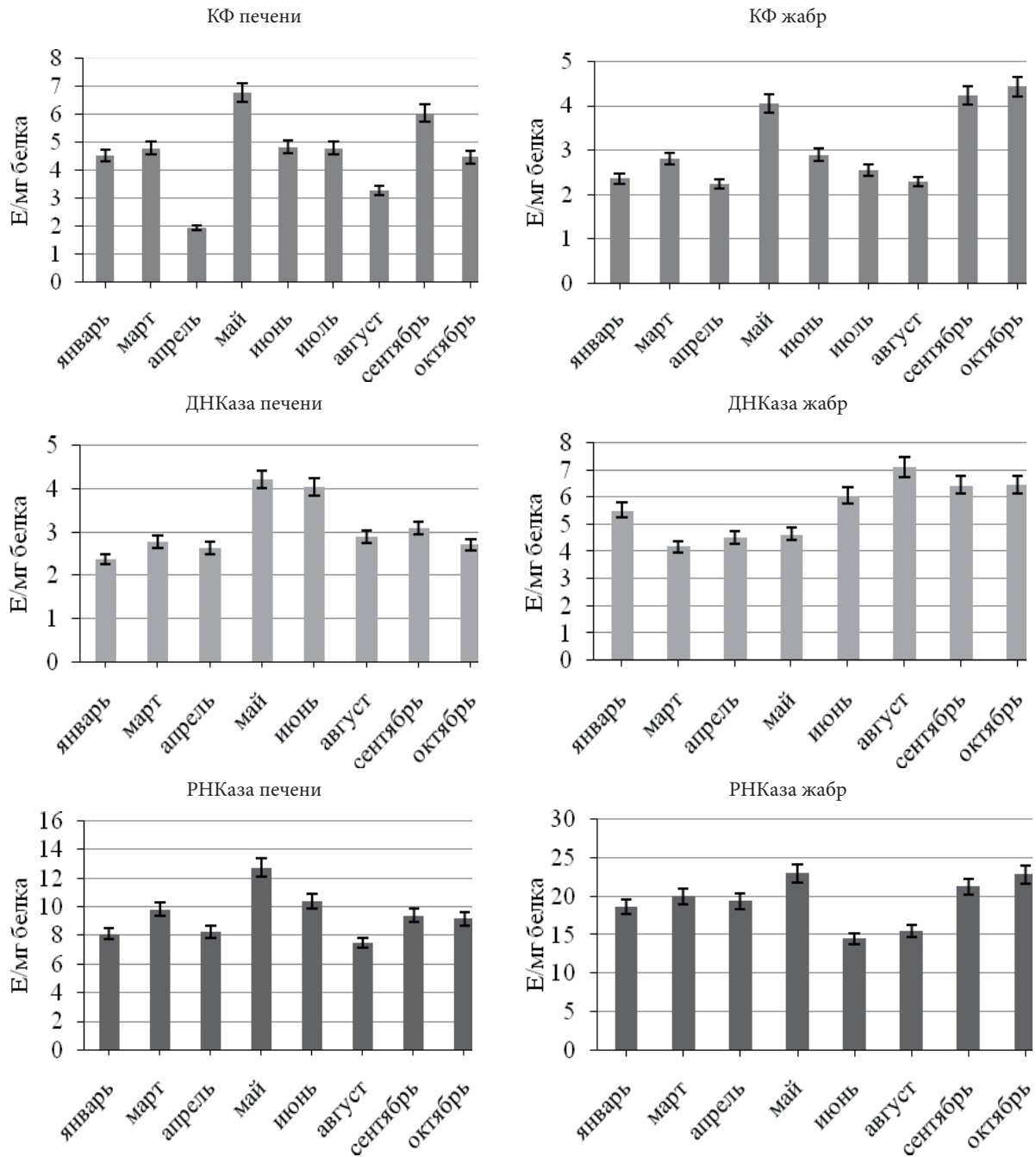


Рис. Активность гидролитических ферментов печени и жабр леща, выловленного в районе Шумаровых островов Рыбинского водохранилища в разные месяцы 2009 г.

После периода относительной стабильности в зимний и предвесенний периоды (январь – апрель) в мае наблюдается всплеск активности всех ферментов (кроме РНКазы в жабрах) и в печени, и в жабрах, что совпадает с началом нереста леща в Рыбинском водохранилище. Очевидно, что резкое увеличение активности ферментов связано с общим повышением уровня физиолого-биохимических процессов в организме рыб: активизацией деятельности

желез внутренней секреции, использованием энергетических резервов, интенсификацией питания и двигательной активности. К концу лета (август) активность всех трех ферментов в печени и активность КФ в жабрах снижается, что, вероятно, связано с прекращением генеративных процессов и наступлением периода нагула, когда обменные процессы связаны, преимущественно, с накоплением питательных веществ. В сентябре и октябре (в период предзимнего особенно активного питания) активность ферментов вновь повышается, что может указывать на интенсификацию процессов внутриклеточного пищеварения с участием лизосомальных ферментов.

Следует отметить, что среди изученных нами ферментов наиболее ярко выраженное изменение в активности в зависимости от отмеченных периодов физиологического состояния свойственно кислой фосфатазе и в меньшей мере нуклеазам. Однако во всех случаях отчетливо прослеживается достаточно синхронная динамика изменений активности всех трех ферментов. Нам представляется логичным предположить, что возможные отклонения от этой динамики могут служить показателями негативных сдвигов в обменных процессах рыб, связанных, в частности, с возможным загрязнением водной среды обитания.

ЛИТЕРАТУРА:

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. 31, № 4.
3. Морозов А.А., Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Функциональное состояние антиоксидантной системы печени леща (*Abramis brama* L.) из районов Рыбинского водохранилища с различной степенью антропогенной нагрузки // III Всерос. конф. по водной токсикологии, конф. по гидроэкологии и школа-семинар: Объединенные материалы. Борок, 11–16 ноября 2008 г. Т. 2.
4. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 216 с.
5. Попов А.П., Коницев 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 микробиол. 2003. 39, № 5.
6. Попов А.П., Цветков И.Л., Коницев А.С. Разделение и характеристика дезоксирибонуклеаз гепатопанкреаса живородки речной в норме и при модельной интоксикации *in vivo* // Биохимия. 2008. 73, Вып. 8.
7. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.
8. Руоколайнен Т.Р., Высоцкая Р.У. Активность лизосомальных ферментов в печени окуня из разных зон Онежского озера // В кн.: Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Изд-во Карел. науч. центра РАН, 1983.
9. Хочака П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
10. Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М., 1980. 283 с.
11. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М., 1972. 367 с.