

УДК664.951.7:639.4

Е.В. Михеев, Р.В. ЕсипенкоДальневосточный государственный рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б**ИЗУЧЕНИЕ СЕЗОННОЙ ДИНАМИКИ ХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
ГЕМОЛИМФЫ ГРЕБЕШКА ПРИМОРСКОГО**

Проведены исследования активности, субстратной специфичности холинэстеразы и содержания белка, в гемолимфе гребешка. Показано снижение концентрации белка в гемолимфе гребешка в летне-осенний период. Установлено увеличение холинэстеразной активности гемолимфы гребешка в августе (субстрат пропионилтиохолин).

Ключевые слова: холинэстераза, субстратная специфичность, гребешок, гемолимфа.

E.V. Mikheev, R.V. Esipenko**SEASONAL DYNAMIC OF SCALLOP HEMOLYMPH CHOLINESTERASE ACTIVITY**

Cholinesterase activity, substrate specificity and protein content in the scallop hemolymph was studied. Displaying decrease of the scallop hemolymph protein concentration in summer-autumn period. Maximum-hemolymphcholinesterases activity observed in August (substrate propionylthiocholine).

Key words: cholinesterase, substrate specificity, scallop, hemolymph.

Проблема мониторинга среды обитания и мест промысла гидробионтов с целью оценки безопасности продукции рыболовства и аквакультуры вследствие широкого применения токсических соединений в быту, производстве и сельском хозяйстве приобретает особую актуальность.

Использование ферментов гидробионтов (как индикаторов загрязнения среды обитания) обуславливается возможностью оценки как комплексного действия поллютантов, так и индивидуальных химических агентов. Ферментативные системы характеризуются высокой чувствительностью, точностью, возможностью проведения быстрого анализа и могут быть использованы на рыбодобывающих и перерабатывающих предприятиях.

Наиболее перспективными для разработки методов оценки загрязнения среды обитания являются гидролазы гидробионтов, отличающиеся высокой чувствительностью и специфичностью к действию пестицидов, токсичных металлов, фосфорорганических соединений и других токсикантов.

Ферменты двустворчатых моллюсков используются как биоиндикатор загрязнения окружающей среды различными поллютантами, в том числе органическими соединениями. Биохимические биомаркеры моллюсков рода *Mytilus*, такие как холинэстераза (ХЭ), глутатион-S-трансфераза и каталаза, широко используются при оценке качества воды [1, 2]. Однако широкая вариабельность показателей ответа биомаркеров на стресс: видоспецифичность уровня проявляемой активности, межвидовые различия в чувствительности к действию поллютантов – налагают определенные ограничения на использование моллюсков как индикаторов среды. Использование при этом биохимических маркеров (глутатион, металлотеонеины, каратиноиды, ферменты углеводного обмена и т.д.) позволяет оценить степень клеточного повреждения под влиянием неблагоприятных факторов среды [3].

Выбор биохимических объектов для экологических исследований не всегда оправдан, так как их свойства могут зависеть от физиологического состояния животного. Однако современный уровень развития естествознания убедительно доказывает, что в основе всех приспособительных изменений биологических систем лежат молекулярные процессы. В первую

очередь на флюктуации параметров внешней среды реагируют ферменты. Особое место среди ферментов занимают холинэстеразы, которые по важности выполняемых ими функций относятся к конститутивным ферментам, а их свойства не зависят от физиологического состояния особи [4].

Целью данной работы являлось исследование сезонной динамики холинэстеразной активности гемолимфы гребешка.

В качестве объектов исследования использовали гребешок приморский (*Patinopecten yessoensis*), выловленный в бухте Северной с мая по октябрь 2015 г. (зал. Славянка, Японское море).

Содержание белка определяли по методу Лоури [5]. Активность холинэстеразы определяли методом Элмана [6].

Проводящая система двустворчатых моллюсков представлена гемолимфой. Гемолимфа – жидкость, циркулирующая в сосудах и межклеточных полостях многих беспозвоночных животных (членистоногих, онихофоров, моллюсков) с незамкнутой системой кровообращения. Гемолимфа выполняет те же функции, что кровь и лимфа у животных с замкнутой системой кровообращения. Гемолимфа состоит из воды, неорганических солей (преимущественно Na^+ , Cl^- и Ca^{2+}) и органических соединений (в основном, углеводы, белки и липиды). Основным переносчиком кислорода является молекула гемоцианина. У моллюсков гемолимфа транспортирует по всему организму кислород и углекислый газ.

Определение некоторых биохимических показателей гемолимфы гребешка показало, что содержание белка составляет 1,22 мг/мл (рис. 1).

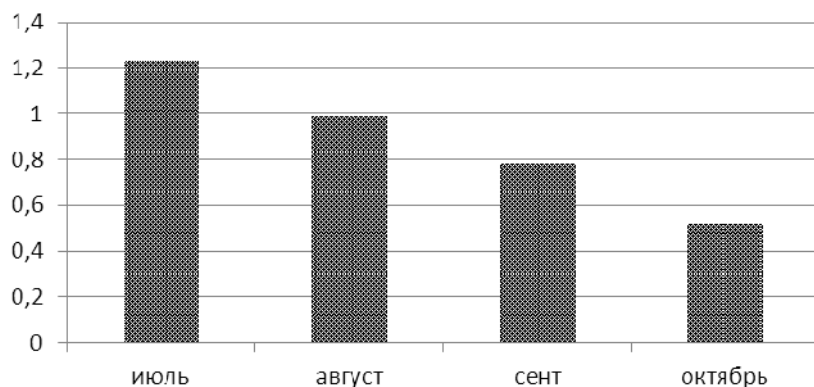


Рис. 1. Концентрация белка в гемолимфе гребешка (мг/мл) в различные сезоны
Fig. 1. The protein concentration in the hemolymph scallop (mg / ml) in different seasons

В сравнении с известными литературными данными, следует отметить, что в гемолимфе гребешка содержание белка в 2 раза больше, чем в гемолимфе брюхоногого моллюска *Hellix* [7], и в 5 раз больше, чем у брюхоногого моллюска из Черного моря *Viviparus* [8].

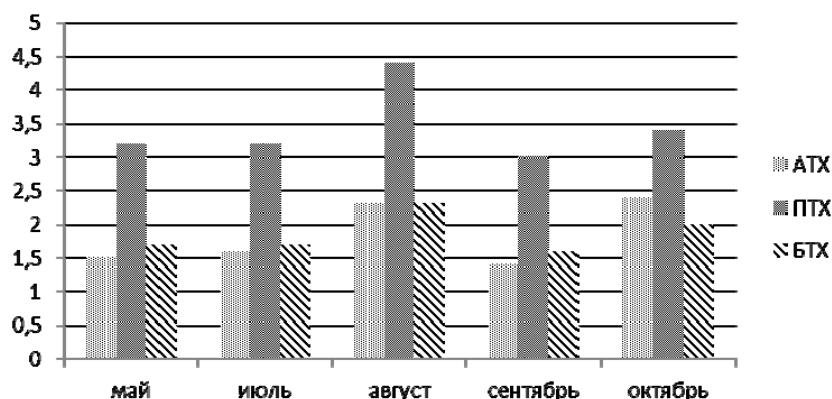
По-видимому, количественное содержание белка является видовым физиологическим признаком и зависит от условий обитания вида.

Одним из молекулярных показателей физиологического состояния моллюсков является активность фермента холинэстеразы в гемолимфе [9].

Проведенное исследование показало, что в гемолимфе гребешка присутствует ХЭ, с различной скоростью катализирующая гидролиз трех тиохолиновых субстратов: ацетилтиохолина (АТХ), пропионилтиохолина (ПТХ) и бутирилтиохолина (БТХ) (рис. 2).

Во-первых, следует отметить, что исследованный фермент с наибольшей скоростью гидролизует ПТХ. Во-вторых, отмечается сезонная динамика показателя активности фермента с использованием в качестве субстрата ПТХ. В период с мая по июль активность фермента и структура субстратной специфичности не различались. В-третьих, в августе отмечено повышение активности фермента в 1,4 раза (субстрат ПТХ). В осенние месяцы активность вновь снижается до показателей, характерных для весеннего периода.

Рис. 2. Скорость гидролиза субстратов под действием ХЭ гемолимфы гребешка (Е/мл)
 Fig. 2. The rate of substrates hydrolysis by the action of ChE hemolymph scallop (U / ml)



Известно, что изменения состава и условий среды обитания проявляются в изменении субстратной специфичности фермента гемолимфы двустворчатых моллюсков [9].

Характеристика ХЭ как молекулярного биомаркера описывается терминологией ферментативной кинетики – величиной удельной активности фермента, отнесенной к белку ткани. В таблице представлены данные по удельной активности ХЭ на 1 мг белка.

Удельная активность ХЭ гемолимфы гребешка
The specific activity of ChE scallop hemolymph

Дата отбора образца	Субстрат	Активность, мМ/мин/мг, белка	Дата отбора образца	Субстрат	Активность, мМ/мин/мг, белка
Май	АТХ	1,3	Август	АТХ	2,3
	ПТХ	2,8		ПТХ	4,4
	БТХ	1,5		БТХ	2,3
Июнь	АТХ	2,1	Сентябрь	АТХ	1,8
	ПТХ	5,5		ПТХ	3,8
	БТХ	2,9		БТХ	2,0
Июль	АТХ	1,3	Октябрь	АТХ	4,6
	ПТХ	2,6		ПТХ	6,5
	БТХ	1,4		БТХ	3,8

В целом, значение удельной активности и соотношение скоростей гидролиза субстратов для каждой даты вылова гребешка аналогичны результатам, полученным по активности фермента в 1 мл гемолимфы. Однако в осенние месяцы (октябрь) отмечено повышение величины удельной активности ХЭ (на мг белка). По-видимому, полученные данные свидетельствуют о снижении суммарного белка в гемолимфе гребешка (рис. 3) и, как следствие, повышение величины удельной активности ХЭ.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено снижение концентрации белка в гемолимфе гребешка в описываемый период. Показано, что максимальная активность холинэстераз в гемолимфе отмечена в августе (субстрат ПТХ). При этом скорость гидролиза ацетил- и бутирилтиохолина под действием ХЭ гемолимфы гребешка в осенне-осенний период значительно не различалась.

Исследование структуры субстратной специфичности ХЭ гемолимфы гребешка показало отсутствие значительных колебаний относительных скоростей гидролиза рассмотренных субстратов, что может быть использовано для мониторинга акватории обитания на предмет загрязнения, а также в качестве биологического маркера физиологического состояния моллюска.

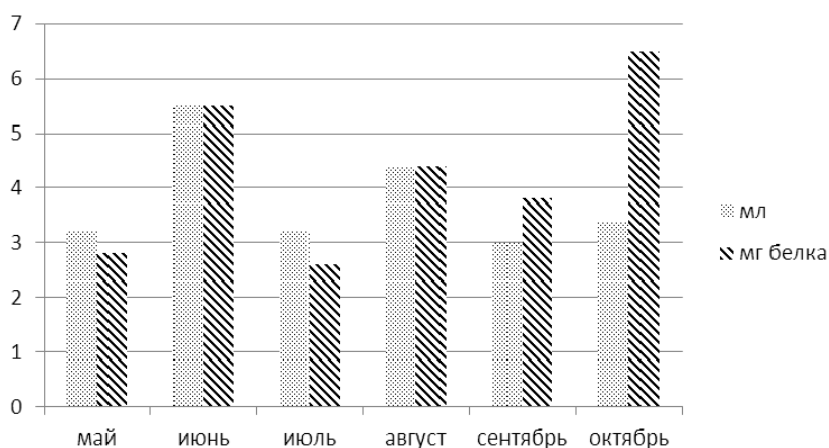


Рис. 3. Сравнение величин активности ХЭ в 1 мл и в 1 мг белка гемолимфы гребешка (субстрат АТХ)
 Fig. 3. Comparison of ChE activity in 1 ml and 1 mg of protein hemolymph scallop (substrate АТC)

Список литературы

1. Tsangaris C., Kormas K., Stroglyoudi E. et al. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline // *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 151, № 3. – P. 369–378.
2. Ковалев, Н.Н. Холинэстеразная активность гемолимфы мидии *Grenomytilus Grayanus* (DUNKER, 1853) (BIVALVIA: MYTILIDAE), обитающей в импактных природных и антропогенных условиях / Н.Н. Ковалев, В.Я. Кавун, Э.Я. Костецкий, Е.В. Михеев, О.В. Подгурская // *Биол. моря.* – 2016. – Т. 42, № 1. – С. 41–47.
3. Лукьянова, О.Н. Молекулярные биомаркеры / О.Н. Лукьянова. – Владивосток: Изд-во ДВГАУ, 2001. – 191 с.
4. Эпштейн Л.М. Сравнительное исследование сериновых гидролаз гидробионтов. Каталитические свойства, выделение, использование в таксономии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 1992. – 43 с.
5. Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–276.
6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – Vol. 7, № 1. – P. 88–95.
7. Ракчий В.К. Межпопуляционные различия биохимических параметров гемолимфы *Helix Pomatia*. // *Науч. ведомости. Сер. Естественные науки.* – 2011. – Вып. 14. – № 3. С. 145–149.
8. Стадниченко, А.П. Влияние терматодной инвазии и сульфата хрома на содержание общего белка в гемолимфе *Viviparus Viviparus* / А.П. Стадниченко, Г.Е. Киричук // *Паразитология.* – 2002. – Вып. 36. – № 3. – С. 240–246.
9. Кавун, В.Я. Адаптация холинэргической системы *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia: Mytilidae) к импактным природным и антропогенным условиям / В.Я. Кавун, А.И. Чепкасова, О.В. Подгурская, Н.Н. Ковалев // *Изв. РАН. Сер. биологическая.* – 2011. – № 2. – С. 220–226.

Сведения об авторах: Михеев Евгений Валерьевич, кандидат технических наук, e-mail: eugene2279@mail.ru;
 Есипенко Роман Владимирович, аспирант, e-mail: azt@bk.ru.