УДК 664.951.7:639.4

Е.В. Михеев, Ю.М. Позднякова, Н.Н. Ковалев
Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИДИИ ГРЕЯ

Исследована сезонная динамика фракционного состава белков мягких тканей мидии. Установлена высокая вариабельность содержания водорастворимых белков в различные сезоны. Показана разнонаправленная сезонная динамика фракционного состава белков мускула-замыкателя. Показано снижение концентрации белка в гемолимфе в летне-осенний период. Установлено увеличение холинэстеразной активности гемолимфы мидии в осенний период до 2,6 Е/мг. Впервые определена активность кислых протеиназ в гемолимфе мидии Грея.

Ключевые слова: *Crenomytilus grayanus, холинэстераза, белки, протеолитическая активность, протеиназы, сезонная динамика.*

E.V. Mikheev, Yu.M. Pozdnyakova., N.N. Kovalev

SEASONAL DYNAMICS OF SOME BIOCHEMYCAL PARAMETERS OF GRAY MUSSEL

Seasonal dynamics of the fractional composition of soft tissue proteins of mussels was studied. A high variability in the content of water-soluble proteins in different seasons has been established. The multidirectional seasonal dynamics of muscle fibers protein fractional composition was shown. The decrease hemolymph protein concentration in the summer-autumn period was shown. Increase of mussels hemolymph cholinesterase activity in autumn was ascertained up to 2,6 U / mg. Activity of acidic proteinases in the hemolymph of Gray mussel was determined for the first time.

Key words: *Crenomytilus grayanus, cholinesterase, proteins, proteolytic activity, proteinases, seasonal dynamics.*

Введение

Интенсивное развитие промышленности и городских структур вдоль побережий, а также огромный рост морских перевозок и других видов деятельности привело к отложению тысячи новых химических веществ и органических соединений, что ставит под угрозу существование организмов и экосистем. Обычные методы биомаркеров используются в экологических исследованиях для адекватной оценки экологического состояния здоровья, управления и устойчивости планирования прибрежных акваторий. В настоящем исследовании используется набор биохимических методов для характеристики биохимических показателей объектов мидии Грея бухты Северной.

Известно, что биохимические показатели характеризуются сезонной динамикой, которая в большей мере определяется физиологическим состоянием объекта и температурой среды его обитания. Так, накопление белков теплового шока в пищеварительной железе и жабрах мидий (Mytilus galloprovincialis) имеет четко выраженную сезонную динамику: максимальное накопление белка обнаружено в летний период. Значимая корреляция между содержанием белков теплового шока и температурой воды предполагает либо прямое влияние температуры на экспрессию белка, либо косвенное влияние, обусловленное наличием пищи и интенсивностью роста [1].

Проблема мониторинга загрязнения среды обитания и мест промыслов гидробионтов токсикантами и определение их остаточных количеств в продуктах переработки требует разработки современных индикаторных экспресс-методов оценки безопасности продукции рыболовства и аквакультуры. Особое значение эта задача приобретает вследствие широкого применения токсических соединений в быту, производстве и сельском хозяйстве.

Использование ферментных систем морских животных как индикаторов состояния среды удобно в тех случаях, когда определить содержание токсикантов в воде химическими методами затруднительно вследствие их низкой и непостоянной концентрации. Содержание же токсикантов в тканях морских животных стабильно и точнее отражает их среднюю концентрацию в воде.

Ферментные системы гидробионтов как биохимические маркеры дают адекватную информацию о нарушениях состояния гидробионтов в условиях загрязнения среды обитания. Использование ферментов (гидролазы, нуклеазы) обуславливаются возможностью оценки как комплексного действия поллютантов, так и индивидуальных химических агентов. Ферментативные тест-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.

В связи с постоянным ужесточением требований к предельно допустимому содержанию токсикантов в среде необходимость в накоплении данных по биохимическому составу тканей и активности ферментов гидробионтов высока. При этом низкие концентрации токсикантов в среде можно определить лишь в том случае, если загрязнитель является не субстратом, а ингибитором или активатором соответствующего ферментативного процесса [2].

Двустворчатые моллюски, в частности мидия, являются объектами экологических исследований [3], так как способны накапливать в своих тканях поллютанты различной химической природы. Ферменты двустворчатых моллюсков используются как биоиндикатор загрязнения окружающей среды различными поллютантами, в том числе органическими соединениями [4].

Целью настоящего исследования являлось изучение сезонной динамики фракционного состава белков мышечных тканей и активности ферментов в гемолимфе мидии Грея в бухте Северной.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования послужил двустворчатый моллюск – мидия Грея (Crenomytilus grayanus), отобранный в бухте Северной (зал. Славянка, Японское море) с мая 2015 г. по август 2016 г.

Источником фермента служили центрифугаты (1000 g) гемолимфы двустворчатых моллюсков. В качестве субстратов холинэстераз использовали тиохолиновые эфиры карбоновых кислот – ацетил-, пропионил- и бутирилтиохолин иодиды (АТХ, ПТХ, БТХ, Sigma, США).

Скорость холинэстеразного гидролиза трех тиохолиновых субстратов определяли калориметрическим методом Эллмана [5].

Кинетические параметры ферментативного гидролиза определяли графически по методу Лайнуивера–Берка [6].

Содержание белка в тканях гидробионтов определяли по методу Лоури [7]. Для щелочерастворимых белков использовали в качестве растворителя 0,01 NNaOH, для солерастворимых – 7 % водный раствор NaCl.

Для определения протеолитической активности в гемолимфе мидии использовали 2 % раствор казеина (в растворимое состояние переводили нагреванием в течение 15 мин) в 0,05 М фосфатном буфере pH 8,0 или 2 % раствор гемоглобина в 0,2 М ацетатном буфере (pH 3,4) и в 0,05 М фосфатном (pH 6,0) [8].

Результаты и обсуждение

Для определения фракционного состава белков было проведено определение соле-, водо- и щелочерастворимых белков в мягких тканях мидии, выловленной в 2014–2015 гг. (рис. 1).

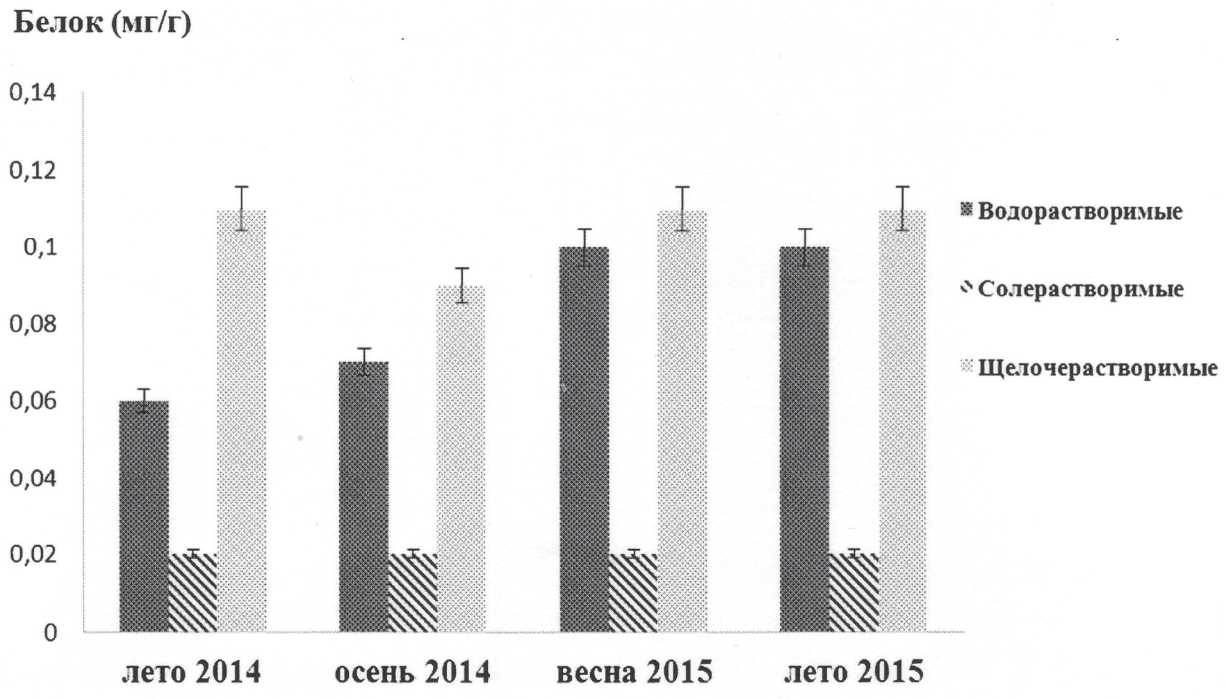

Рис. 1. Сезонная динамика показателей фракционного состава белков пучка мягких тканей мидии

Fig. 1. Seasonal dynamics mussel soft tissue proteins fractional composition

Во-первых, следует отметить, что в мягких тканях моллюска преобладают водо- и щелочерастворимые белки. Во-вторых, отмечаются межгодовые различия. Так, содержание водорастворимых белков в образцах 2014 г. было в 1,7 раза ниже, чем в летних образцах 2015 г. (рис. 1).

На примере образцов 2015 г. показано, что фракционный состав белков пучка мягких тканей образцов мидии весеннего и летнего сборов не выявил различий. В то же время анализ образцов мидии, собранных в 2014 г., показывает, что содержание щелочерастворимых белков снижается от летнего периода к осеннему.

Анализ фракционного состава белков мускула-замыкателя показал, что как и в мягких тканях целиком преобладают щелочерастворимые белки (рис. 2). Наименьшее содержание в мускуле отмечено для солерастворимых белков. Выявленная закономерность характерна для мышечных белков.

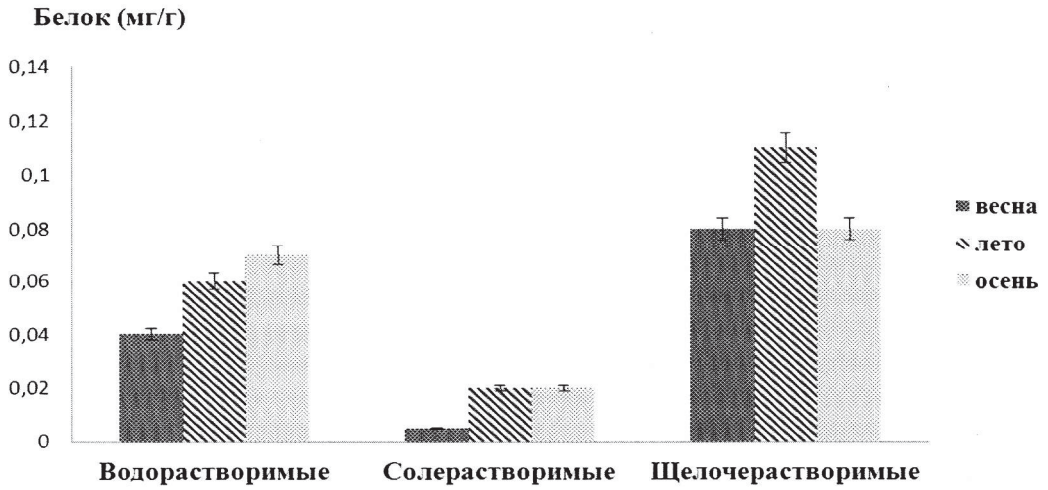

Рис. 2. Сезонная динамика показателей фракционного состава белков мускула-замыкателя мидии
Fig. 2. Seasonal dynamics of mussel closure muscle proteins fractional composition

Определение сезонной динамики показало, что в весенне-осенний период происходит накопление всех фракций белков в мышечной ткани мидии. Исключение составляют щелочерастворимые белки, содержание которых максимально в летний период.

Отличная сезонная зависимость фракционного состава выявлена для мантии мидии (рис. 3). В исследованной ткани содержание водо- и солерастворимых белков не различалось в течение трех исследованных сезонов. В то же время содержание в мантии мидии солерастворимых белков в летне-осенний период меньше, чем в весенний.

Следует отметить, что концентрации белков в мускуле-замыкателе и мантии мидии были практически равными во все сезоны. Исключение составляет более высокая концентрация солерастворимых белков в мантии мидии в весенний период по сравнению с содержанием данной фракции белков в мускуле-замыкателе.

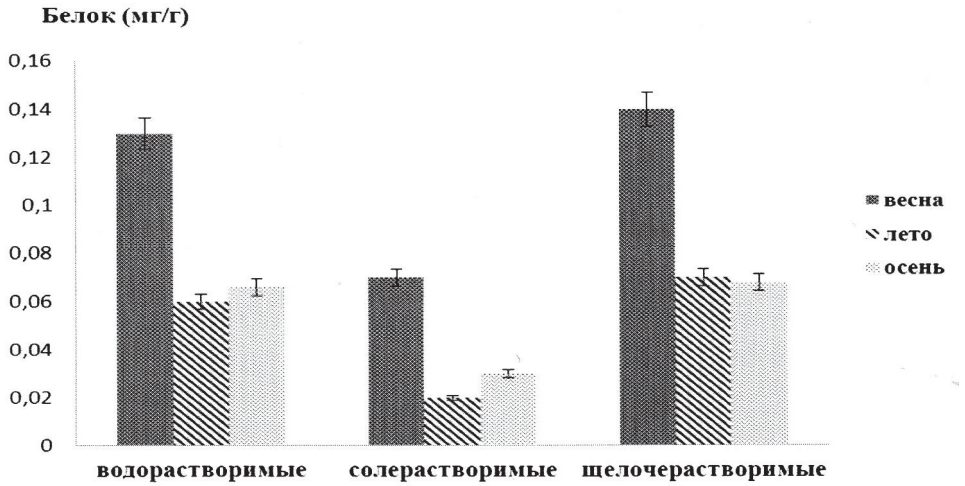

Рис. 3. Сезонная динамика показателей фракционного состава белков мантии мидии
Fig. 3. Seasonal dynamics of mussel mantle proteins fractional composition

Проводящая система двустворчатых моллюсков представлена гемолимфой. Гемоли́мфа – жидкость, циркулирующая в сосудах и межклеточных полостях многих беспозво-

ночных животных (членистоногие, онихофоры, моллюски) с незамкнутой системой кровообращения. Содержание белка в гемолимфе является диагностическим признаком физиологического состояния животного.

В ходе работ проведено исследование сезонных изменений концентрации белка в гемолимфе мидии (рис. 4).

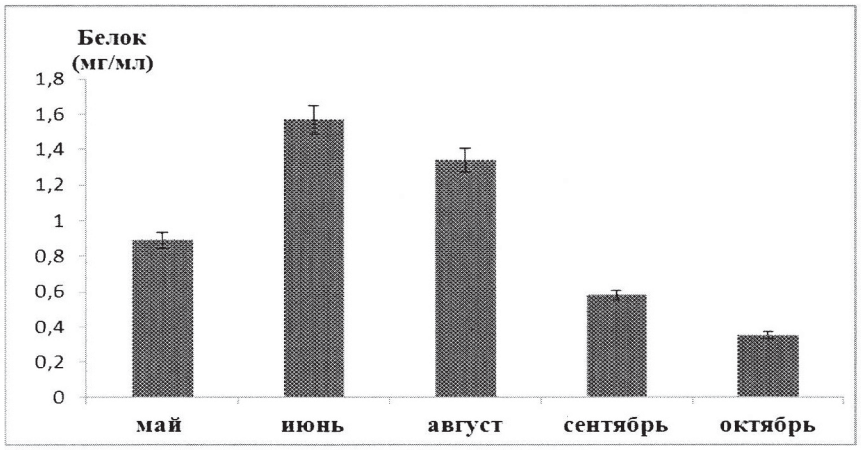

Рис. 4. Динамика сезонных изменений концентрации белка в гемолимфе мидии
Fig. 4. Dynamics of seasonal changes mussels' hemolymph protein concentration

Проведенные исследования показали, что с мая по июнь происходит рост концентрации белка в гемолимфе моллюска (рис. 4). Наибольшая концентрация белка в гемолимфе наблюдалась в летний период. При этом пик содержания белка приходится на июнь – 1,58 мг/мл. В дальнейшем концентрация белка в гемолимфе мидии снижается к осени, до значения в октябре 0,3 мг/мл. Такая сезонная динамика изменений концентрации белка в гемолимфе мидии коррелирует с жизненным циклом моллюска.

Проведенные ранее исследования указывают на присутствие во всех организмах различных типов холинэстераз (ХЭ), различающихся субстратной специфичностью [9], [10], [11]. Исходя из этого, позвоночные и беспозвоночные обладают различными типами ХЭ, которые должны быть полностью охарактеризованы перед их использованием в экологических исследованиях [12], [13].

В гемолимфе мидии была определена активность ХЭ и изучена динамика ее изменения в течение летне-осеннего сезона.

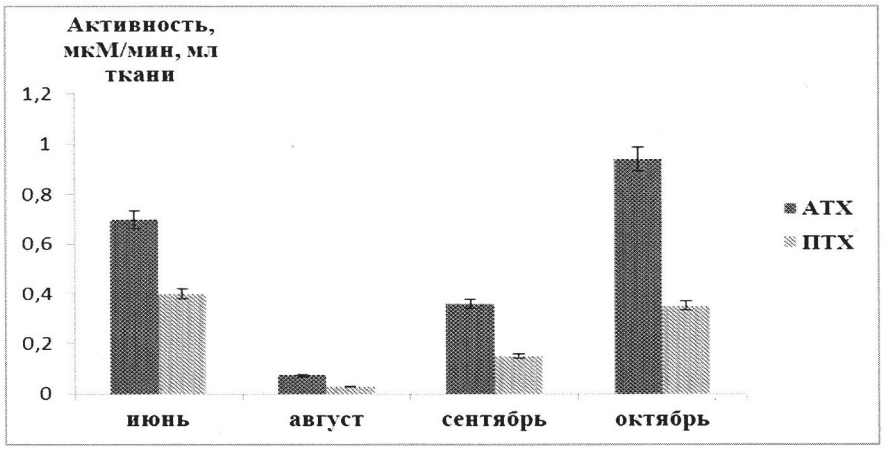

Рис. 5. Активность ХЭ гемолимфы мидии в различные сезоны 2015 г.
Fig. 5. Hemolymph mussel's cholinesterase activity in different seasons of 2015

Как видно из представленных на рис. 5 данных, ХЭ гемолимфы мидии катализировала гидролиз только двух исследованных субстратов. По этому признаку, а также соотношению скоростей гидролиза фермент можно отнести к типичным ацетилхолинэстеразам. Отмечается сезонная динамика изменений активности фермента. Так, скорость гидролиза субстратов снижалась в период от июня к августу и далее возрастала к октябрю. Величина активности фермента в 1 мл сыворотки в августе была на порядок ниже, чем в июне. Увеличение активности фермента в период от августа к октябрю происходило в 12,5 раза (субстрат АТХ). Столь значительные колебания активности ферментов гемолимфы мидии, очевидно, связаны биохимическими перестройками нерестового периода.

Определение величины удельной активности ХЭ на мг белка показало аналогичную тенденцию изменений определяемого параметра (рис. 6).

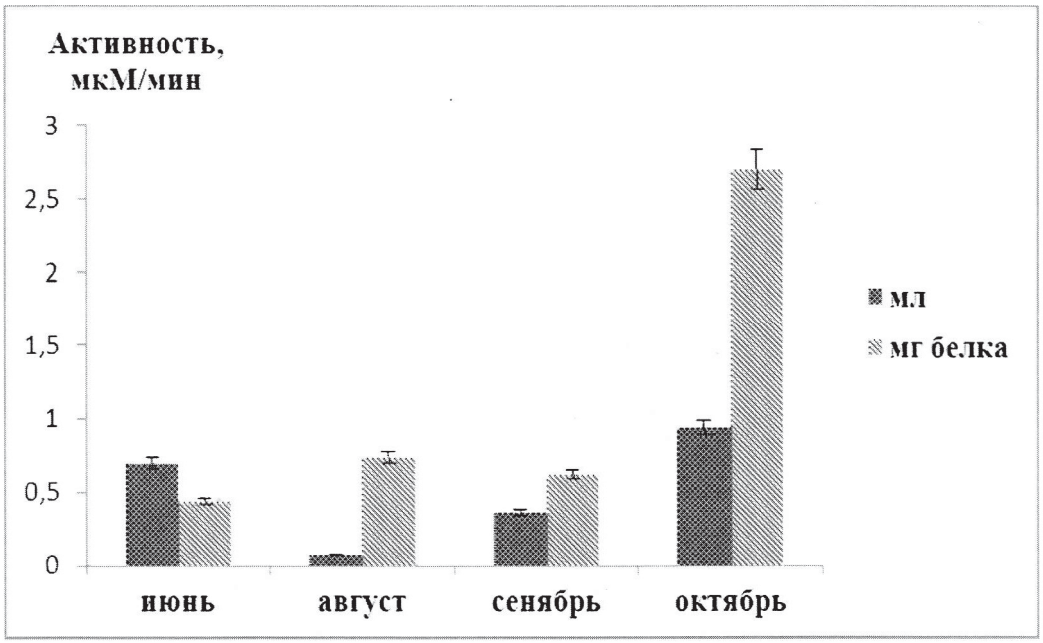

Рис. 6. Динамика изменений величины активности ХЭ в гемолимфе мидии различных сезонов вылова (субстрат АТХ)

Fig. 6. Dynamics mussel's hemolymph cholinesterase activity of changes in the value of different catch seasons (substrate acetylthiocholine)

Для ХЭ гемолимфы мидии в осенний период наблюдается увеличение величины удельной активности на мг белка (рис. 6). Такая закономерность объясняется сезонным снижением концентрации белка в гемолимфе (см. рис. 4).

В исследуемый период в гемолимфе мидии проведены исследования активности протеолитических ферментов. Полученные данные представлены в таблице.

Установлено, что протеолитическая активность в гемолимфе мидии обнаруживалась не во все сезоны вылова 2015 г. Так, в августе в гемолимфе мидии обнаружена активность нейтральных (0,002 Е\мг белка) и кислых протеиназ (0,004 мг/белка). Тогда как в сентябре выявлена активность только кислых протеаз (0,012 Е/мг белка), таблица.

В то же время активность кислых протеиназ в образцах 2016 г. обнаруживалась во все исследованные сезоны. Максимальная величина удельной активности кислых протеиназ была отмечена в гемолимфе мидии, выловленной в августе 2016 г. Также следует отметить, что в образце гемолимфы мидии, выловленной в апреле 2016 г., выявлена активность кислых, нейтральных и щелочных протеаз.

Активность протеаз в гемолимфе мидии
Proteases activity of mussel's hemolymph

Дата	Активность протеаз, Е/мл (Е/мг белка)		
	pH 8,0	pH 6,0	pH 3,4
2015 г.			
Май	0	0	0
Июнь	0	0	0
Июль	0	0	0
Август	0,003 (0,002)	0	0,005 (0,004)
Сентябрь	0	0	0,0069 (0,012)
Октябрь	0	0	0
2016 г.			
Апрель	0,031 (0,0044)	0,015 (0,025)	0,003 (0,005)
Май	0,0035 (0,002)	0	0
Июнь	0,022 (0,015)	0	0
Июль	0,005 (0,013)	0	0
Август	0,035 (0,07)	0	0

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали, что фракционный состав белков мягких тканей мидии не изменялся в весенне-осенний период. При этом отмечена высокая вариабельность концентрации водорастворимых белков в мягких тканях мидии.

Сезонная динамика фракционного состава мускула-замыкателя и мантии имеет разнонаправленный характер в рассматриваемый период: в мускуле-замыкателе происходит увеличение содержания белков всех фракций в весенне-осенний период, в то время как в мантии количественное содержание фракций белков в этот период снижается.

Выявлена сезонная динамика изменений концентрации белка в гемолимфе мидии: снижение показателя в летне-осенний период составляет 5,3 раза.

Определено, что активность холинэстеразы в гемолимфе мидии в летний период мало изменяется и составляет в среднем 0,5 Е/мг белка. В осенний период значение удельной активности увеличивается до 2,6 Е/мг белка.

Впервые в гемолимфе мидии обнаружена активность кислых протеиназ, закономерности сезонной динамики которых в данном исследовании установить не удалось.

Полученные данные по мониторингу различных биохимических параметров в тканях мидии Грея, выловленной в бухте Северной в 2014–2016 гг., позволяют сделать заключение о возможности использования активности холинэстеразы гемолимфы мидии Грея в качестве маркера состояния акватории в данном районе.

Список литературы

1. Minier C., Borghi V., Moore M.N., Porte C. Seasonal variation of mxr and stress proteins in the common mussel, mytilus galloprovincialis // Aquatic Toxicology. – 2000. – Vol. 50, № 3. – P. 167–176.

2. Евтюгин, Г.А. Биосенсоры для определения ингибиторов в окружающей среде / Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников, Е.Б. Никольская // Успехи химии. – 1999. – Т. 68, № 12. – С. 1142–1167.

3. 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.

4. Лукьянова, О.Н. Молекулярные биомаркеры / О.Н. Лукьянова. – Владивосток: Изд-во: ДВГАУ, 2001. –191 с.

5. 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.

6. Корниш-Боуден, Э. Основы ферментативной кинетики: монография / Э. Корниш-Боуден. – М.: Мир, 1979. – 280 с.

7. Lowry O., Rosenbrough N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. B1iol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–276.

8. Каверзнева, Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз / Е.Д. Каверзнева // Прикладная биохимия и микробиология. – 1971. – Т. 7, № 2. – С. 225–228.

9. Valbonesi P., Sartor G., Fabbri E. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosur veillance programmes // Sci. Environ. – 2003. – Vol. 312. – P. 79–88.

10. Brown M., Davies I.M., Moffat C.F., Redshaw J., Craft J.A. Characterisation of cholineesterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (Mytilusedulis) // Mar. Environ. Res. – 2004. – Vol. 5. – P. 155–169.

11. Tortelli V., Colares E.P., Robaldo R.B., Nery L., Pinho G., Bianchini A., Monserrat J.M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish // Chemosphere. – 2006. – Vol. 65, № 4. – P. 560–566.

12. Domingues I., Agra A. R., Monaghan K., Soares A., Nogueira A. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination // Environ. Toxicol.Chem. – 2010. – Vol. 29, № 4. – P. 929–938.

13. Choi J.Y., Yu J.Y., Dong B., Ra K.K., Kyung T., Hong G. H., Shin, K.H. Acetylthiocholine (ATC) - Cleaving cholinesterase (ChE) activity as a potential biomarker of pesticide exposure in the Manila clam // Ruditapesphilippinarum, of Korea Mar. Environ. Res. – 2011. – Vol. 71, № 3. – P. 162–168.

Сведения об авторах: Михеев Евгений Валерьевич, кандидат технических наук,
e-mail: eugene2279@mail.ru;
Позднякова Юлия Михайловна, кандидат технических наук,
e-mail: pozdnyakova.julia@yandex.ru;
Ковалев Николай Николаевич, доктор биологических наук,
e-mail: kovalevnn61@yandex.ru.