

УДК 597.2/.5:577.1(262.5)

МЕЖВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ОКИСЛЕННЫХ ФОРМ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНОВ В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

Залевская И. Н.¹, Подунай Ю. В.², Ковыригина Т. Б.³

¹ Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, *inz3@mail.ru*

² ФГБУН "Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского - природный заповедник РАН", Феодосия, п. Курортное, *grab-ua@yandex.ru*

³ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, Севастополь, *mtk.fam@mail.ru*

В работе приводятся данные о межвидовых особенностях активности катепсина Д, содержании окисленных модифицированных форм белков и среднемолекулярных олигопептидов в сыворотке крови и мышцах 6 массовых видов черноморских рыб, обитающих в прибрежных водах Севастополя. Выявленные различия, обусловлены в большей степени особенностями биологии каждого конкретного вида (физиологическим состоянием особей, стадией репродуктивного цикла, интенсивностью питания), чем его принадлежностью к той или иной экологической группе.

Ключевые слова: рыбы, сыворотка крови, мышцы, катепсин Д, среднемолекулярные олигопептиды, окисленные формы белков.

ВВЕДЕНИЕ

Для оценки качества водной среды в настоящее время широко применяются методы экологического мониторинга с использованием биохимических маркеров состояния гидробионтов (Руднева, 2010). Загрязнители, попадающие в морскую среду в результате хозяйственной деятельности человека, вызывают существенное нарушение обмена веществ у морских организмов, индикаторами чего являются разные биохимические показатели – биомаркеры. К ключевым неспецифическим биомаркерам «патологического» белкового метаболизма относятся показатели окислительной модификации белков (ОМБ) (Van der Oost, 2003), содержание среднемолекулярных олигопептидов (СМО) (Карякина, Белова, 2004) и активность лизосомальных протеиназ (катепсин Д) (Немова, Высоцкая, 2004).

Присутствие ксенобиотиков в среде запускает сложный механизм их детоксикации, в результате которого происходит образование активных форм кислорода (АФК), способных повреждать биологические молекулы, в том числе и белки (Меньщикова, Зенков, 1993). Этот процесс осуществляется как при непосредственном повреждении генетического материала, ответственного за синтез белков, так и за счет процессов окислительной модификации белковых молекул, следствием чего является нарушение их пространственной конфигурации, дальнейший протеолиз, или накопление в клетках различных тканей (Арчаков, Мохосеев, 1989). Одним из лизосомальных ферментов, катализирующим расщепление белков до аминокислот и среднемолекулярных продуктов протеолиза – олигопептидов, является катепсин Д – аспаратная пептидил-пептидгидролаза (Высоцкая, Немова, 2008). По своему строению среднемолекулярные олигопептиды близки к регуляторным пептидам и способны соединяться и блокировать рецепторы любой клетки, неадекватно влияя на ее метаболизм и функции (Карякина, Белова, 2004). Содержание олигопептидов в тканях определяет уровень эндогенной интоксикации и зависит от протеазной активности и процессов элиминации эндотоксинов из организма животных.

В то же время биохимический статус и обмен веществ любого организма определяется генетическими особенностями таксона, к которому относится вид, а также специфическими метаболическими адаптациями данного вида к конкретным условиям среды обитания (Ирейкина, Лукьянова, 2011). Исследование комплекса показателей белкового обмена у представителей разных экологических групп необходимо для понимания роли каждого из

компонентов в обеспечении чувствительности и устойчивости организма к факторам внешней среды.

В связи с этим, целью работы явилось изучение показателей окислительной модификации белковых молекул, уровня среднемолекулярных олигопептидов и активности катепсина Д в сыворотке и мышцах массовых видов черноморских рыб, относящихся к разным экологическим группам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили прибрежные виды черноморских рыб, относящиеся к разным экологическим группам: морской налим (*Gaidropsarus mediterraneus* Linnaeus, 1758) (n=21) – представитель донной группы, султанка (*Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927) (n=18), спикара (*Spicara flexuosa* Rafinesque, 1810) (n=27) и мерланг (*Merlangius merlangus euxinus* Nordmann, 1840) (n=25) – придонно-пелагической группы и пелагическая ставрида (*Trachurus mediterraneus* Aleev, 1956) (n=31). Рыб отлавливали в прибрежной зоне г. Севастополя (Черное море) в зимний период 2003–2005 гг.

У рыб отбирали кровь для получения сыворотки обычным методом и извлекали мышечную ткань. Гомогенаты готовили в холодном физиологическом растворе, после чего центрифугировали 20 минут при 9000 g на холоду.

В сыворотке крови и тканевых экстрактах определяли содержание окисленных форм белков. Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Образовавшиеся в результате реакции производные 2,4-динитрофенилгидразона регистрировали при длинах волн 346, 370, 430, 530 нм (Дубинина и др., 2000). Все определения проводили на спектрофотометре Specol-211 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Активность катепсина Д в сыворотке крови и мышечных экстрактах рыб определяли модифицированным методом Дингла по гидролизу 1% раствора бычьего гемоглобина в 0,35 М ацетатном буфере (рН 3,2) в единицах измерения оптической плотности (E750, соответственно) на 1 г сырой массы ткани за время инкубации (37 °С) (Дингл, 1980).

Содержание низкомолекулярных олигопептидов определяли по спонтанной окислительной модификации белков в 0,1 М фосфатном буфере. Оптическую плотность кислоторастворимых пептидов регистрировали при длинах волн 254, 272, 280 нм (Дубинина и др., 1995).

Статистический анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными в случае, если $p \leq 0,05$ (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание продуктов нейтрального и основного характера имело максимальные значения в сыворотке крови ставриды и спикары, минимальные – у морского налима (табл. 1). Интенсивность ОМБ в сыворотке крови придонной султанки и придонно-пелагического мерланга находилась на одном уровне. Величина ПО ОМБ 13,26 и 13,70 соответственно.

Значения показателей окисления белков в мышцах (г ткани) султанки превышали соответствующие значения других видов рыб ($p \leq 0,001$) (табл. 2).

Вторую позицию по уровню содержания окисленных белковых молекул в мышцах занимает ставрида ($p \leq 0,001$), далее мерланг ($p \leq 0,01$), налим ($p \leq 0,001$) и спикара ($p \leq 0,001$). Исследование тестируемых параметров в пересчете на мг белка позволило установить определенные различия (табл. 3). В порядке убывания значения ПО ОМБ, отражающего интенсивность процессов ОМБ в мышцах исследуемых видов рыб, их можно расположить следующим образом: ставрида → налим → мерланг → спикара → султанка.

Таблица 1

Уровень окислительной модификация белков в сыворотке крови некоторых видов черноморских рыб (е.о.п./ мл)

| Вид | продукты нейтрального характера | | продукты основного характера | | ПО ОМБ |
|----------|---------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------|--------|
| | альдегидные 346 нм | кетонные 370 нм | альдегидные 430 нм | кетонные 530 нм | |
| Налим | 3,84±0,21 | 5,07±0,29 | 2,76±0,18 | 0,27±0,02 | 11,94 |
| Султанка | 4,10±0,12 | 5,11±0,16 | 3,80±0,09* | 0,25±0,06 | 13,26 |
| Спикара | 5,63±0,21*° | 7,29±0,24*° | 4,04±0,11* | 0,59±0,02*° | 17,55 |
| Мерланг | 4,18±0,15 [■] | 5,59±0,24 [■] | 3,47±0,13*° [■] | 0,46±0,03*° [■] | 13,70 |
| Ставрида | 5,32±0,13*° | 7,44±0,12*° | 3,78±0,13* | 0,56±0,09*° | 17,10 |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,05-0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; [■] – то же по сравнению со значениями спикары; [●] – то же по сравнению со значениями мерланга. ПО ОМБ – показатель общей окислительной модификации белков (арифметическая сумма значений 2,4-динитрофенилгидразонов, полученных при всех длинах волн).

Таблица 2

Уровень окислительной модификация белков в мышцах некоторых видов черноморских рыб (ед. опт. плотн./ г ткани)

| Вид | продукты нейтрального характера | | продукты основного характера | | ПО ОМБ |
|----------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|--------|
| | альдегидные 346 нм | кетонные 370 нм | альдегидные 430 нм | кетонные 530 нм | |
| Налим | 2,93±0,02 | 3,88±0,03 | 2,47±0,025 | 0,12±0,004 | 9,40 |
| Султанка | 5,85±0,06* | 5,12±0,05* | 3,78±0,04* | 0,31±0,012* | 15,06 |
| Спикара | 1,89±0,02*° | 4,12±0,02*° | 2,03±0,015*° | 1,12±0,007*° | 9,16 |
| Мерланг | 3,32±0,05*° [■] | 4,58±0,03*° [■] | 2,60±0,03*° [■] | 0,215±0,007*° [■] | 10,71 |
| Ставрида | 3,99±0,03*° [●] | 4,58±0,03*° [■] | 2,22±0,03*° [●] | 1,57±0,02*° [●] | 12,36 |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,01-0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; [■] – то же по сравнению со значениями спикары; [●] – то же по сравнению со значениями мерланга.

Таблица 3

Уровень окислительной модификация белков в мышцах некоторых видов черноморских рыб (ед. опт. плотн./ мг белка)

| Вид | продукты нейтрального характера | | продукты основного характера | | ПО ОМБ |
|----------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|--------|
| | альдегидные 346 нм | кетонные 370 нм | альдегидные 430 нм | кетонные 530 нм | |
| Налим | 36,27±1,19 | 44,60±2,07 | 32,75±1,87 | 1,49±0,13 | 115,11 |
| Султанка | 33,55±1,58 | 40,31±1,95 | 22,13±1,19* | 1,64±0,06 | 97,63 |
| Спикара | 26,52±0,83*° | 41,68±1,34 | 19,45±0,80* | 13,08±0,83*° | 100,73 |
| Мерланг | 34,90±1,50 [■] | 41,66±1,76 [■] | 30,21±1,03° [■] | 1,47±0,06 [■] | 108,24 |
| Ставрида | 108,68±3,87*° [●] | 123,72±2,47*° [●] | 58,71±1,83*° [●] | 44,73±2,03*° [●] | 335,84 |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; [■] – то же по сравнению со значениями спикары; [●] – то же по сравнению со значениями мерланга.

Активность катепсина Д в пересчете на 1 г ткани имела максимальные значения в мышцах придонно-пелагической спикары по сравнению с соответствующими значениями других видов рыб ($p \leq 0,01$) (табл. 4). Минимальные значения активности фермента обнаружены у придонного налима и придонно-пелагического мерланга ($p \leq 0,001$).

В то же время исследование активности этого фермента в пересчете на белок позволило установить другие тенденции. Так, активность катепсина Д в мышцах ставриды существенно превышала соответствующие показатели у других видов рыб ($p \leq 0,001$). Минимальные значения фермента обнаружены у придонной султанки ($p \leq 0,001$).

Таблица 4

Активность катепсина Д в мышцах некоторых видов черноморских рыб

| Вид | (Е 270/ г ткани/ч) | (Е 270/ мг белка/ч) |
|----------|--------------------|---------------------|
| Налим | 0,094±0,006 | 1,148±0,024 |
| Султанка | 0,142±0,006* | 0,694±0,018* |
| Спикара | 0,175±0,007*° | 1,603±0,023*° |
| Мерланг | 0,096±0,010°■ | 1,175±0,020°■ |
| Ставрида | 0,144±0,009*■• | 3,776±0,034*°■• |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,01-0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; ■ – то же по сравнению со значениями спикары; • – то же по сравнению со значениями мерланга.

В дальнейшем интерес представляло оценить уровень содержания токсичных для организма среднемoleкулярных фрагментов распада белков в тканях (табл. 5). Уровень эндогенной интоксикации был выше в сыворотке морского налима по сравнению с таковым у других видов рыб ($p \leq 0,001$). В наименьших количествах среднемoleкулярные продукты протеолиза присутствовали в сыворотке спикары ($p \leq 0,01-0,001$).

Таблица 5

Содержание среднемoleкулярных олигопептидов в сыворотке крови некоторых видов черноморских рыб (ед. опт. плотн./ мл сыворотки)

| Вид | Е ₂₅₄ | Е ₂₇₂ | Е ₂₈₀ | ∑ СМО |
|----------|------------------|------------------|------------------|-------|
| Налим | 1,510±0,023 | 0,613±0,012 | 0,522±0,012 | 2,645 |
| Султанка | 1,229±0,034* | 0,598±0,029 | 0,246±0,018* | 2,073 |
| Спикара | 1,155±0,026* | 0,473±0,021*° | 0,351±0,020*° | 1,979 |
| Мерланг | 1,544±0,027°■ | 0,431±0,010*° | 0,326±0,011*° | 2,301 |
| Ставрида | 1,325±0,042*■• | 0,478±0,024*° | 0,349±0,017*° | 2,152 |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,01-0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; ■ – то же по сравнению со значениями спикары; • – то же по сравнению со значениями мерланга. ∑ СМО – арифметическая сумма значений среднемoleкулярных олигопептидов, полученных при всех длинах волн.

В то же время в мышечной ткани суммарный показатель СМО был выше у мерланга, за счет высокого содержания продуктов протеолиза, регистрируемых при Е₂₅₄, тогда как их концентрация при Е₂₇₂ и Е₂₈₀ была выше у ставриды (табл. 6).

У налима и султанки значения ∑ СМО примерно одинаковы, однако содержание олигопептидов, регистрируемых при Е₂₅₄, выше у налима ($p \leq 0,001$), тогда как при других длинах волн прослеживается обратная тенденция ($p \leq 0,001$).

Таблица 6

Содержание среднемолекулярных олигопептидов в мышцах некоторых видов черноморских рыб (ед. опт. плотн./ г белок)

| Вид | E ₂₅₄ | E ₂₇₂ | E ₂₈₀ | ∑ СМО |
|----------|------------------|------------------|------------------|-------|
| Налим | 0,987±0,019 | 0,295±0,008 | 0,182±0,009 | 1,464 |
| Султанка | 0,833±0,015* | 0,353±0,009* | 0,219±0,004* | 1,405 |
| Мерланг | 1,535±0,090*° | 0,276±0,007° | 0,151±0,006*° | 1,962 |
| Ставрида | 0,902±0,018*°• | 0,567±0,013*°• | 0,303±0,018*°• | 1,772 |

Примечание к таблице. * – различия достоверны ($p \leq 0,01-0,001$) по сравнению со значениями налима; ° – то же по сравнению со значениями султанки; • – то же по сравнению со значениями мерланга.

Таким образом, сравнительный анализ исследуемых показателей позволил установить наличие межвидовых отличий. В наших исследованиях максимальное значение активности катепсина Д (мг белка/ ч) обнаружено у ставриды, но в пересчете на г ткани активность этого фермента была снижена по сравнению с таковой у спикары. Выявленная особенность свидетельствует о включении протеолитических ферментов в деградацию мышечных белков и переход на эндогенное питание, что связано с особенностями биологии данного вида. Зимой, ставрида совсем, или почти не питается, сбивается в косяки и пассивно держится на глубинах (Световидов, 1964).

Как известно, созревание гонад у рыб также сопровождается активацией лизосомальных ферментов, что свидетельствует об усилении в тканях процессов катаболизма, направленных на реутилизацию менее важных для организма в настоящий момент структур и обеспечение гонад материалом для генеративного синтеза. В исследованиях на самках лосося было установлено, что наибольшие потери белка в преднерестовый период характерны для белых мышц, сердца и печени – органах с высоким белковым обменом (Высоцкая, Немова, 2008). В нашей работе среди исследованных пяти видов рыб только два находились в состоянии нереста – зимненерестующие налим и мерланг. Специфическая активность катепсина Д в мышечной ткани (мг белка) у этих двух видов была ниже по сравнению с таковой у ставриды и спикары, но выше, чем у султанки. В то же время неспецифическая активность этой гидролазы (в пересчете на г ткани) была в 1,5 раза ниже в мышцах нерестящихся видов рыб по сравнению с соответствующими значениями у других видов в состоянии покоя, что может свидетельствовать о расщеплении мышечного белка в процессе созревания гонад и нереста.

Необходимо отметить, что самая низкая активность катепсина Д установлена у султанки (мг белка/ ч), тогда как в пересчете на 1 г ткани значения этого показателя были на уровне с таковым у ставриды, что говорит о стабильном состоянии лизосомальных ферментных систем и согласуется с особенностями биологии этого вида. Зимой султанка находится в стадии покоя, интенсивность питания и метаболическая активность снижается, что характерно и для спикары. Различия между активностью катепсина Д у этих двух видов, вероятно, обусловлены разным уровнем метаболизма: спикара более активна по сравнению с султанкой.

В то же время вынужденное голодание обуславливает дефицит низкомолекулярных антиоксидантов и микроэлементов, необходимых для синтеза антиоксидантных ферментов в организме рыб (Олексюк, Янкович, 2010). Как следствие, смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия в сторону процессов СРО приводит к окислительной модификации биомолекул и инициирует активность протеолитических ферментов, что подтверждают высокие значения показателей ОМБ в мышцах и сыворотке ставриды и катепсина Д в мышцах рыб (табл. 4).

У налима и мерланга значения ПО ОМБ в мышцах (мг белка) незначительно превосходили таковые у султанки и спикары, а в пересчете на г ткани – были ниже, чем у султанки, что является свидетельством активации катаболических процессов в мышечной

ткани у нерестящихся видов рыб. В результате этого содержание средномолекулярных олигопептидов возрастало в мышцах и сыворотке крови голодающей ставриды и нерестящихся налима и мерланга. В то же время, установленные нами отличия в содержании окисленных форм белков и средномолекулярных продуктов их распада в мышечной ткани и сыворотке исследованных видов рыб могут отражать межвидовую специфику метаболических превращений в этих тканях и интенсивность процессов элиминации олигопептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ исследуемых показателей позволил установить, что специфическая активность катепсина D ниже в мышцах нерестящихся рыб, по сравнению с таковой у рыб, находящихся в стадии покоя. Выявленная особенность может свидетельствовать о расщеплении мышечного белка в период созревания гонад и нереста. Показатели окислительной модификации белковых молекул и содержание средномолекулярных олигопептидов у нерестящихся видов рыб, также свидетельствуют об активации катаболических процессов в их мышцах.

Максимальные значения содержания продуктов ОМБ и средномолекулярных олигопептидов, а также активности катепсина D было установлено в тканях ставриды, что может быть связано с высоким уровнем метаболических процессов и особенностями биологии этого вида.

Таким образом, результаты межвидового анализа исследуемых биомаркеров позволили установить ряд отличий, которые, по нашему мнению, в большей степени обусловлены особенностями биологии каждого конкретного вида (физиологическим состоянием особей, стадией репродуктивного цикла, интенсивностью питания), чем его принадлежностью к той или иной экологической группе.

Список литературы

- Арчаков А. И., Мохосеев Н. М. Модификация белков активным кислородом и их распад // Биохимия. – 1989. – Вып. 2. – С. 179–186.
- Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука, 2008. – 284 с.
- Дингл Дж. Методы исследования. – М.: Мир, 1980. – 344 с.
- Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов Г.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24.
- Дубинина Е. Е., Морозова М. Г., Леонова Н. В., Гампер Н.Л. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 398–409.
- Ирейкина С. А., Лукьянова О. Н. Активность антиоксидантных ферментов и уровень перекисного окисления липидов у рыб из эстуарной зоны реки Раздольная (Приморский край) // Мат. IV всероссийской конф. по водной экотоксикологии «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы». (Часть 1), 24-29 сентября 2011 г.: тезисы докл. – Борок, 2011. – С. 118–121.
- Карякина Е. В., Белова С. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 3. – С. 3–8.
- Лакин Р. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Меньщикова Е. Б., Зенков Н. К. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 3. – С. 442–445.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. И. Биохимическая индикация состояния рыб. – М.: Наука, 2004. – 215 с.
- Олексюк Н. П., Янкович В. Г. Активність про- і антиоксидантних систем у печінці прісноводних риб у різні пори року // Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 3. – С. 41–47.
- Руднева И. И. Морская экотоксикология // Экологические системы и приборы. – 2010. – № 2. – С. 3–11.
- Световидов А. Н. Рыбы Черного моря. – Л.: Наука, 1964. – 550 с.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2003. – Vol. 13, № 2. – P. 57–149.

Zalevskaya I. N., Podunay J. V., Kovyrshina T. B. Interspecies peculiarities of oxidized proteins content and cathepsin D activity in the tissues of Black Sea fish

Interspecies peculiarities of the cathepsin D activity, content of oxidized proteins and oligopeptides in the blood

serum and muscle of 6 highly distributed Black Sea fish species inhabited coastal waters in Sevastopol region belonging to different ecological groups were studied. These differences are determined by the biology of each species (physiological state of animals, stage of the reproductive cycle, feeding intensity), and belongs to the ecological group.

Key words: fish, blood serum, muscle, cathepsin D, oligopeptides, oxidized proteins.

Поступила в редакцию 07.12.2015 г.