

ГИДРОХИМИЯ, ГИДРОБИОЛОГИЯ,  
ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

УДК 597.556.331.1:577.1:504.054(262.5)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОМАРКЕРОВ ПЕЧЕНИ МОРСКОГО  
ЕРША *SCORPAENA PORCUS LINNAEUS*, 1758 ИЗ СЕВАСТОПОЛЬСКИХ  
АКВАТОРИЙ (ЧЕРНОЕ МОРЕ) С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ<sup>1</sup>

© 2020 г. И. И. Чеснокова<sup>а</sup>, Т. Б. Сигачева<sup>а</sup>, \*, Е. Н. Скуратовская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФИЦ “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН”,  
Севастополь, 299011 Россия

\*e-mail: mtk.fam@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2019 г.

После доработки 11.09.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Проведен сравнительный анализ некоторых биохимических показателей печени морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 из акваторий г. Севастополя (Черное море) с разным уровнем комплексного загрязнения. Установлено достоверное увеличение содержания продуктов окислительной модификации белков, перекисного окисления липидов и активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы в печени ершей из более загрязненных акваторий (Стрелецкая и Александровская) по сравнению с аналогичными показателями рыб из бух. Казачьей. Рассмотрены причины выявленных отличий и информативность исследованных биомаркеров для оценки качества морских прибрежных акваторий.

**Ключевые слова:** морской ерш, печень, комплексное загрязнение, окислительный стресс, биомаркеры, Черное море.

**DOI:** 10.31857/S0321059620030050

## ВВЕДЕНИЕ

Среди наиболее актуальных природоохранных проблем Черноморского региона выделяют нормирование потоков поступления загрязняющих веществ в морскую среду [4] и разработку системы оценки качества морских прибрежных акваторий [14]. Современные антропогенные воздействия на морские прибрежные экосистемы, как правило, — комплексные, и даже при контроле значительной части загрязнителей определить количественное содержание всех из них не представляется возможным. Большое разнообразие загрязняющих веществ, попадающих в морские водоемы, приводит к их взаимодействию, в ряде случаев — к возникновению новых соединений с неизвестными свойствами, а также к эффектам

синергизма и антагонизма при их воздействии на гидробионтов. Кроме того, в морские акватории выпадают стоки рек со всего водосборного бассейна, что вместе с трансграничным переносом токсикантов значительно усиливает антропогенную нагрузку на прибрежные районы, осложняет поиск источников их загрязнения [9]. В связи с этим наряду с традиционными физико-химическими методами исследования качества водной среды международными организациями (EU BEEP, MOLAR, SETAC, LIMPACs) рекомендовано применение методов биоиндикации, отражающих реакцию биоты на весь комплекс негативного влияния среды в целом.

Применение этого подхода требует подбора биоиндикаторных видов и информативных биомаркеров, позволяющих оценить степень нарушения биологических функций гидробионтов в условиях многофакторного антропогенного прессинга [14]. Для ранней биоиндикации морских акваторий рекомендовано использовать комплекс биохимических показателей, позволяющих на молекулярном уровне оценить изменения, происходящие в организме животных до появления видимых патологий, своевременно определить существующие риски, провести природоохранные мероприятия [1, 8].

<sup>1</sup> Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118021490093-4; “Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана”, регистрационный номер НИОКТР: АААА-А18-118020890074-2; при поддержке РФФИ и г. Севастополя в рамках научного проекта № 18-34-50005 (“Наставник”).

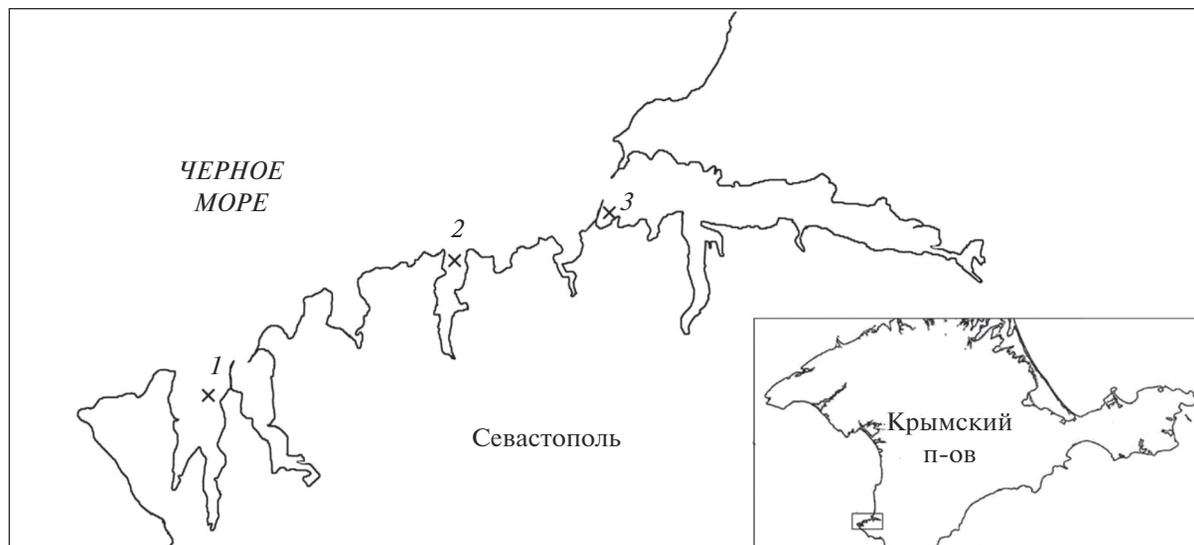


Рис. 1. Картограмма территории расположения районов отбора рыб. Бухты: 1 – Казачья, 2 – Стрелецкая, 3 – Александровская.

Для проведения биоиндикационных исследований в акваториях г. Севастополя в качестве биоиндикаторного вида авторами был выбран морской ерш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 и комплекс биохимических показателей – биомаркеров, рекомендованных для этих целей: прямые биомаркеры тканевого повреждения при окислительном стрессе (ОС) – уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) [15, 20] и показатели функционального состояния печени (активность аминотрансфераз и щелочной фосфатазы (ЩФ)) рыб [16, 18].

Цель работы – сравнительная оценка комплекса биохимических показателей печени морского ерша *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 из бухт г. Севастополя (Черное море) с разным уровнем комплексного загрязнения.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служил морской ерш *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (Scorpaenidae) – типичный представитель черноморской ихтиофауны. Рыб отлавливали в июне 2018 г. в трех севастопольских бухтах (Стрелецкая,  $n = 11$ ; Александровская,  $n = 15$ ; Казачья,  $n = 10$ ) (рис. 1), грунты которых характеризуются разным уровнем загрязнения хлорорганическими соединениями (ХОС) [7], нефтяными углеводородами (НУ) и хлороформ-экстрагируемыми веществами (ХЭВ) [10, 11, 13].

По данным Л.В. Малаховой с соавторами [2018], наиболее загрязнены ХОС донные отложения бухт Стрелецкой и Александровской, тогда

как в грунтах бух. Казачьей эти соединения присутствовали в более низких концентрациях [7]. Среднее содержание СПХБ<sub>6</sub> в донных отложениях бухт Стрелецкой и Александровской составило 100 и 110 (нг г<sup>-1</sup> на сухую массу) соответственно, а концентрация ΣДДТ – 51 и 35 (нг г<sup>-1</sup> на сухую массу) [7]. Распределение НУ и ХЭВ в грунтах районов отбора проб соответствовало таковому для ХОС. Максимальное содержание НУ и ХЭВ отмечено в донных отложениях бухт Стрелецкой (105 и 200 (мг 100 г<sup>-1</sup> возд.-сух. д. о.)) [13] и Александровской (94 и 270 (мг 100 г<sup>-1</sup> возд.-сух. д. о.)) [10], тогда как в грунтах бух. Казачьей концентрация НУ и ХЭВ составила 23.4 и 60 (мг 100 г<sup>-1</sup> возд.-сух. д. о.) соответственно [11].

Исследования проводили на нерестящихся самках морского ерша доминантной возрастной группы (4–5 лет).

Материалом для биохимических исследований служила печень рыб. Печень несколько раз промывали холодным 0.85% физраствором, гомогенизировали и центрифугировали (10000g) 15 мин на холоде. Для дальнейшего анализа использовали супернатант.

В супернатантах определяли содержание окисленных форм белков (опт. ед/мг белка) по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином. Образовавшиеся в результате реакции производные 2,4-динитрофенилгидразона регистрировали при следующих длинах волн (λ): альдегидные и кетонные продукты нейтрального характера при 356 и 370 нм соответственно, альдегидные и кетонные продукты основного характера при 430 и 530 нм [3].

**Таблица 1.** Содержание окисленных форм белков и ТБК-активных продуктов в печени морского ерша *Scorpaena porcus* из севавтопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Бухты	Продукты нейтрального характера, опт. ед/мг белка		Продукты основного характера, опт. ед/мг белка		ТБК, нмоль ТБК/мг белка
	альдегидные 356 нм	кетонные 370 нм	альдегидные 430 нм	кетонные 530 нм	
Александровская	0.099 ± 0.016	0.120 ± 0.018	0.066 ± 0.012	0.025 ± 0.006	9.28 ± 1.3
Стрелецкая	0.067 ± 0.017	0.082 ± 0.016	0.038 ± 0.010*	0.019 ± 0.004	13.43 ± 3.02
Казачья	0.027 ± 0.004*, **	0.042 ± 0.005*, **	0.018 ± 0.003*, **	0.006 ± 0.001*	5.69 ± 0.67*, **

\* Достоверность различий между показателями печени морского ерша из бухт Александровской и др.

\*\* То же из бухт Стрелецкой и Казачьей.

**Таблица 2.** Показатели функционального состояния печени морского ерша *Scorpaena porcus* из севавтопольских акваторий с разным уровнем загрязнения

Бухты	АЛТ, мкмоль/ч мг белка	АСТ, мкмоль/ч мг белка	ЩФ, нмоль/с мг белка
Александровская	0.53 ± 0.07	0.27 ± 0.05	781 ± 106
Стрелецкая	0.29 ± 0.06*	0.20 ± 0.05	1071 ± 207
Казачья	0.35 ± 0.10	0.05 ± 0.01*, **	103 ± 12*, **

\* Достоверность различий между показателями печени морского ерша из бухт Александровской и др.

\*\* То же из бухт Стрелецкой и Казачьей.

Содержание ТБК-активных продуктов (нмоль ТБК/мг белка) регистрировали по реакции с тиобарбитуровой кислотой [12].

Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) (мкмоль/(ч мг белка)), аланинаминотрансферазы (АЛТ) (мкмоль/(ч мг белка)) и щелочной фосфатазы (ЩФ) (нмоль/(с мг белка)) определяли с использованием стандартных наборов реактивов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия).

Все определения проводили на спектрофотометре “СФ-2000” (ОКБ “Спектр”, г. Санкт-Петербург, Россия). Биохимические показатели пересчитывали на 1 мг белка сырой массы ткани, концентрацию которого определяли с использованием стандартного набора реагентов “ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ” (Россия).

Результаты обрабатывали статистически, вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку средней. Достоверность различий между выборками оценивали с применением *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0.05$ . Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ Past 3 и Microsoft Office Excel 2016.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание окисленных форм белков и вторичных продуктов ПОЛ – ТБК-активных продуктов в печени морского ерша из севавтопольских акваторий с разным уровнем комплексного загрязнения представлено в табл. 1.

Уровень продуктов ОМБ в печени морского ерша из бухт Александровской ( $\lambda = 356$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $\lambda = 370$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $\lambda = 430$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $\lambda = 530$ ,  $p \leq 0.05$ ) и Стрелецкой ( $\lambda = 356$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $\lambda = 370$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $\lambda = 430$ ,  $p \leq 0.05$ ) был достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями рыб из бух. Казачьей. Сравнительный анализ показателей ОМБ в печени морского ерша из бухт Стрелецкой и Александровской не показал достоверных различий, за исключением более высокого содержания альдегидопроизводных основного характера в печени рыб из последней акватории ( $p \leq 0.05$ ) (табл. 1).

Так же как и в случае с уровнем ОМБ, содержание ТБК-активных продуктов в печени морского ерша из бухт Александровской ( $p \leq 0.05$ ) и Стрелецкой ( $p \leq 0.05$ ) достоверно выше по сравнению с таковым у рыб из бух. Казачьей. Достоверных различий между значением данного показателя в печени морского ерша из бухт Стрелецкой и Александровской не установлено (табл. 1).

Показатели функционального состояния печени морского ерша из разных бухт г. Севастополя представлены в табл. 2.

Активность АСТ в печени морского ерша из бухт Александровской и Стрелецкой ( $p \leq 0.001$ ) достоверно выше, чем у рыб из бух. Казачьей. Активность АЛТ в печени морского ерша из бух. Александровской достоверно превалировала ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с таковой у рыб из бух. Стрелецкой (табл. 2).

Активность ЩФ имела максимальные значения в печени ершей из бух. Стрелецкой и снижалась в ряду: бух. Стрелецкая → бух. Александровская → бух. Казачья. В печени рыб из бух. Казачьей активность ЩФ была в 10 раз ниже по сравнению с таковой у рыб из бух. Стрелецкой ( $p \leq 0.001$ ) и в 7.5 раза ниже, чем у рыб из бух. Александровской ( $p \leq 0.001$ ) (табл. 2).

Таким образом, результаты сравнительного анализа некоторых биомаркеров печени морского ерша из трех севастопольских бухт позволили установить определенные различия, которые могут быть связаны с уровнем комплексного загрязнения районов исследования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом ключевой роли активных форм кислорода (АФК) и свободно-радикальных процессов в механизмах токсичности широкого спектра загрязнителей для биоиндикационной оценки качества водной среды рекомендовано применение показателей ОС. Уровень ОС определяется буферной емкостью антиоксидантной (АО) защитной системы, обезвреживающей АФК, и интенсивностью свободнорадикальных процессов. Универсальный показатель ОС при действии отдельных токсикантов и комплексном загрязнении акваторий – увеличение в тканях гидробионтов содержания продуктов ПОЛ и ОМБ [15, 17]. В настоящей работе содержание продуктов ПОЛ и ОМБ достоверно выше в печени рыб из акваторий с более высоким уровнем загрязнения ХОС, НУ и ХЭВ (Стрелецкая, Александровская) по сравнению с аналогичными показателями рыб из бух. Казачьей (табл. 1). Выявленные различия свидетельствуют о влиянии комплексного загрязнения бухт Стрелецкой и Александровской на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени рыб и о смещении реакций в сторону процессов свободно-радикального окисления (СРО) белков и липидов.

Другие важнейшие биомаркеры, характеризующие функциональное состояние печени рыб, – ферменты аминотрансферазы, выполняющие ключевую роль в метаболизме аминокислот и белков, а также ЩФ – фермент фосфорно-кальциевого обмена. Как известно, основные суб-

страты для синтеза всех протеиногенных аминокислот – пируват, оксалоацетат и  $\alpha$ -кетолуат [5] – продукты реакций переаминирования, катализируемых аминотрансферазами. Анализ аминотрансферазной активности в печени ершей из трех севастопольских акваторий позволил установить увеличение активности АСТ у особей из более загрязненных бухт Стрелецкой и Александровской по сравнению с таковой в печени рыб из бух. Казачьей (табл. 2). Выявленные особенности на фоне высокого содержания продуктов ОС в тканях рыб из бухт Стрелецкой и Александровской (табл. 1), вероятно, обусловлены компенсаторной перестройкой белкового метаболизма, направленной на увеличение субстратного обеспечения реакций глюконеогенеза и синтеза аминокислот в печени ершей из районов с высоким уровнем комплексного загрязнения. В [18] установлено увеличение активности аминотрансфераз, содержания окисленных форм белков и пирувата и снижение концентрации лактата в печени кумжи *Salmo trutta* и хариуса *Thymallus thymallus* при действии хлорамина. Результаты исследований авторы [18] объяснили значительной ролью аминотрансфераз и лактат-пируватной конверсии в образовании пирувата для энергообеспечения синтетических процессов в гепатоцитах при действии хлорамина [18]. Увеличение активности АСТ и АЛТ в печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) было также показано при вирусной инфекции IPNV [2].

В то же время активность АЛТ достоверно выше в печени рыб из бух. Александровской по сравнению с аналогичными показателями рыб из бух. Стрелецкой (табл. 2), а содержание продуктов ПОЛ и ОМБ в их тканях имело неоднозначный характер (табл. 1). Уровень ТБК-активных продуктов в печени рыб из этих акваторий не показал достоверных различий, но был выше у рыб из бух. Стрелецкой. Содержание окисленных форм белков при всех длинах волн было выше в печени рыб из бух. Александровской, однако достоверные изменения установлены только для альдегидопроизводных основного характера. Согласно данным [2], активность АЛТ в печени радужной форели увеличивалась в большей степени, чем активность АСТ с 5-го по 22-й день после инфицирования рыб вирусом IPNV, что авторы объяснили разной локализацией ферментов в клетке. При повреждении гепатоцитов АЛТ поступает, в первую очередь, в кровяное русло, иницируя компенсаторное увеличение активности этого фермента в печени [2]. Таким образом, увеличение активности АЛТ и содержания альдегидопроизводных основного характера в печени морского ерша из бух. Александровской по сравнению с соответствующими показателями ершей из близкой по уровню комплексного загрязнения бух. Стрелецкой, вероятно, может свидетельство-

вать о менее экологически благополучном состоянии первой акватории.

Как и активность АСТ, активность ЩФ в печени ерша из бухт Стрелецкой и Александровской была достоверно выше по сравнению с таковой у рыб из бух. Казачьей (табл. 2). При важной роли ферментов фосфорно-кальциевого обмена (ЩФ) в процессах созревания гонад и роста гидробионтов [21] выявленная особенность может свидетельствовать о компенсаторном увеличении активности ЩФ в печени нерестающихся самок морского ерша из наиболее загрязненных акваторий (бухты Александровская, Стрелецкая). Компенсаторное увеличение активности ЩФ в печени тиляпии (*Tilapia guineensis*) было также показано при действии тяжелых металлов (Pb 2.65 мг/л, Fe 0.85 мг/л) [19].

### ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ комплекса биохимических показателей печени морского ерша из тестируемых акваторий г. Севастополя позволил выявить определенные отличия и характеризовать экологическое состояние районов исследования. Достоверное увеличение содержания продуктов ОМБ, ПОЛ и активности аминотрансфераз и ЩФ в печени ершей из более загрязненных акваторий – бухт Стрелецкой и Александровской по сравнению с аналогичными показателями рыб из бух. Казачьей свидетельствует об окислительном повреждении гепатоцитов, перестройке белкового метаболизма и менее экологически благоприятном состоянии первых двух акваторий. Установленное авторами ранее отсутствие достоверных различий между размерно-массовыми характеристиками морского ерша из трех тестируемых акваторий [6] свидетельствует об устойчивости данного вида к наблюдаемой степени комплексного загрязнения бухт Стрелецкой и Александровской в результате перестройки биохимических процессов.

Вышеперечисленные биомаркеры печени морского ерша информативны для оценки качества морских прибрежных акваторий и могут быть использованы при проведении биоиндикационных исследований на всем побережье Черного моря и в других водоемах естественного обитания данного вида.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Высоцкая Р.У., Немова Н.Н.* Лизосомальные ферменты у рыб. М.: Наука, 2008. 282 с.
2. *Драган Л.П., Майстренко М.И., Любченко А.А., Рудь Ю.П., Бучацкий Л.П.* Активность аминотрансфераз в печени радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) под влиянием вирусной инфекции //

- Рибогосподарська Наука України. 2015. № 3 (33). С. 99–106.
3. *Дубинина Е.Е., Бурмистов С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г.* Окислительная модификация белков сыровотки крови человека, метод ее определения // Вопросы мед. химии. 1995. № 1. С. 24–26.
4. *Егоров В.Н.* Нормирование потоков антропогенного загрязнения черноморских регионов по биогеохимическим критериям // Экология моря. 2001. Вып. 57. С. 75–84.
5. *Кондрашова М.Н.* Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 3. С. 388–403.
6. *Куцын Д.Н., Скуратовская Е.Н., Чеснокова И.И.* Возраст и рост морского ерша *Scorpaena porcus* (Scorpaenidae) Черного моря в условиях антропогенного пресса // Вопросы ихтиологии. 2019. Т. 59. № 3. С. 292–299.
7. *Малахова Л.В., Скуратовская Е.Н., Малахова Т.В., Болтачев А.Р., Лобко В.В.* Хлороорганические соединения в ерше *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 в акватории Севастополя (Черное море): пространственное распределение и биологический отклик на уровень накопления загрязнителей // Морской биол. журнал. 2018. Т. 3. № 4. С. 51–63.
8. *Немова Н.Н., Высоцкая Р.У.* Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 214 с.
9. *Руднева И.И.* Использование биомаркеров рыб для оценки экологического состояния морских акваторий // Наук. зап. Тернопольский нац. пед. ун-ту. Сер. Биол. 2013. № 2 (55). С. 68–73.
10. Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века / Под ред. О.Г. Миронова, С.В. Алёмова. Симферополь: ИТ “АРИАЛ”, 2018. 276 с.
11. *Соловьева О.В., Тихонова Е.А., Воинова Т.В.* Органические вещества донных отложений в условиях урбанизации побережья (на примере бухты Казачьей, Черное море) // Океанология. 2019. Т. 59. № 2. С. 234–242.
12. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
13. *Тихонова Е.А., Котельянец Е.А., Волков Е.Г.* Характеристика загрязнения донных отложений прибрежной акватории Севастополя на примере Стрелецкой бухты (Черное море) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2018. № 1. С. 74–80.
14. Экоотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя / Под ред. И.И. Рудневой. М.: ГЕОС, 2016. 360 с.
15. *de Moura F.R., Brentegani K.R., Gemelli A., Sinhorin A.P., Sinhorin V.D.G.* Oxidative stress in the hybrid fish *Leiaris marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* exposed to Roundup Original // Chemosph. 2017. V. 185. P. 445–451.
16. *Recabarren-Villalón T., Ronda A.C., Arias A.H.* Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and potential bio-

- markers in a native South American marine fish // Reg. Studies in Marine Sci. 2019. V. 29. P. 1–11.
17. *Stoliar O.B., Lushchak V.I.* Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish. In *Oxidative Stress – Environmental Induction and Dietary Antioxidants* / Ed. V. Lushchak. 2012. P. 131–166. <https://doi.org/10.5772/38094>
  18. *Tkachenko H., Kurhaluk N., Grudniewska J.* Effects of chloramine-T exposure on oxidative stress biomarkers and liver biochemistry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), brown trout, *Salmo trutta* (L.), and grayling, *Thymallus thymallus* (L.) // Arch. Pol. Fish. 2013. V. 21. P. 41–51.
  19. *Udotong J.I.R.* Assessment of Diagnostic Enzymes as Indices of Heavy Metal Pollution in Tilapia Fish // World Acad. Sci. Engineering Technol. Int. J. Biotechnol. Bioengineering. 2015. V. 9. № 6. P. 670–674.
  20. *van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E.* Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk assessment: a Review // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2003. V. 13. Is. 2. P. 57–149.
  21. *Zikic R.V., Stajn S., Pavlovic Z., Ognjanovic B.I., Sagic Z.S.* Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium // Physiol. Res. 2001. V. 50 (1). P. 105–111.