

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ СТОЙКИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ НА ГИДРОБИОНТОВ

Рассмотрены биохимические аспекты ответа защитных систем организма на действие ксенобиотиков. Показана возможность использования комплекса молекулярных маркеров - показателей антиоксидантной системы, перекисного окисления липидов и активности фермента первой фазы биотрансформации ксенобиотиков для изучения биологических эффектов у рыб, вызываемых стойкими органическими загрязнителями.

Введение

Сложившийся способ организации хозяйственной деятельности человека неизбежно сопряжён с загрязнением водной среды. Масштабы антропогенного загрязнения обуславливают необходимость своевременных научно обоснованных оценок его последствий.

На сегодняшний день в экологических исследованиях состояния водных объектов оценка биологических эффектов проводится с применением различных подходов. В последние годы в целях биомониторинга наряду с классическими методами водной токсикологии в большей мере начали применяться экспресс-методы, основанные на анализе тонких биохимических изменений, происходящих в организме при появлении источника неблагоприятного воздействия. Биохимические показатели (молекулярные маркеры) являются сигналами возникновения угрозы развития патологических процессов и могут использоваться для своевременного выявления повреждающего действия факторов среды на биоту. Биомаркеры свидетельствуют о действии токсиканта на организм даже в сублетальных концентрациях [1, 2].

А.А. Морозов*,
младший научный
сотрудник
лаборатории
физиологии
и токсикологии
водных животных,
Учреждение
Российской
академии наук
Институт биологии
внутренних вод
им. И.Д. Папанина
РАН
(ИБВВ РАН)



Цель данной работы – обобщение информации о применении комплекса биохимических показателей в качестве биомаркеров присутствия стойких органических загрязнителей (СОЗ) в среде обитания рыб. Комплекс включает уровень активности компонентов антиоксидантной системы, фермента первой фазы биотрансформации ксенобиотиков, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в органах рыб.

Результаты и их обсуждение

Биохимические механизмы токсического действия и метаболизм ксенобиотиков СОЗ водных объектов в большинстве своём представлены липофильными ксенобиотиками. В связи с этим они способны легко проникать через клеточные мембраны жабр, кожи, органов пищеварительной системы, что обуславливает их высокую биодоступность для рыб. Последующая судьба

* Адрес для корреспонденции: aleksey.a.morozov@gmail.com

и биологические эффекты чужеродных соединений в значительной степени зависят от возможности их включения в процесс биотрансформации. Биотрансформация липофильных соединений состоит из двух фаз. В первой фазе, оксидативной, главная роль принадлежит оксигеназным системам, которые, окисляя гидрофобные молекулы ксенобиотика, увеличивают его водорастворимость. Во второй фазе продукты оксигеназных реакций конъюгируют с различными водорастворимыми эндогенными соединениями посредством трансфераз (и некоторых других групп ферментов) и удаляются экскреторными органами [3].

Универсальной оксигеназой, обнаруженной у представителей животного, растительного и бактериального миров, является цитохром P450 [4]. В рамках проблемы поступления СОЗ в водные экосистемы для оценки биологических эффектов удобно использовать уровень активности фермента-монооксигеназы – этоксирезорифин-О-диэтилазы (ЭРОД, КФ 1.14.14.1), который относится к подсемейству CYP1A-содержащих оксигеназ (цитохром P450 семейство 1 подсемейство А). Попадая в организм рыб, ксенобиотики вызывают индукцию CYP1A, которая проявляется в повышении активности ЭРОД [5].

В некоторых случаях повышенная ЭРОД-активность может быть единственным свидетельством воздействия быстро метаболизируемых соединений, присутствие которых методы аналитической химии не в состоянии выявить в тканях. ЭРОД-анализ способен указывать на воздействие многокомпонентных химических смесей, что является необходимой характеристикой применяемого в биомониторинге инструмента. Немаловажен тот факт, что ЭРОД-активность свидетельствует о кумулятивном воздействии ксенобиотиков безотносительно к тому, приводят они к токсическому процессу, или нет [6].

Ксенобиотики вызывают индукцию ферментов-трансформаторов, активируя транскрипцию генов. Обычно ксенобиотик считают индуктором, если он активирует ядерный рецептор, тем самым вызывая увеличение экспрессии генов-мишеней этого рецептора. В неактивированном состоянии арил-углеводородный рецептор (AhR) находится в цитоплазме, в комплексе с димером БТШ 90, кошапероном p23, иммунофилин-подобным белком, называемым белком, взаимодействующим с AhR (AIP, известный также как ARA9 или XAP2). Во время активации этого комплекса лигандом Ah-рецептор отделяется и перемещается к ядру, где образует гетеромер с AhR-ядерным переносчиком (ARNT). AhR-ARNT гетеродимеры связы-

В.В. Юрченко,
младший научный
сотрудник
лаборатории
физиологии
и токсикологии
водных животных,
Учреждение
Российской
академии наук
Институт биологии
внутренних вод
им. И.Д. Папанина
РАН
(ИБВВ РАН)

ваются с ДНК-последовательностями в 5'-регуляторных областях генов-мишеней и взаимодействуют с различными коактиваторами, корепрессорами, и (или) основными факторами транскрипции, определяя таким образом скорость транскрипции генов. Последовательности ДНК, которые связываются с AhR-ARNT, называют элементами, способными реагировать с ксенобиотиками [7].

Усиление функционирования монооксигеназной системы, обусловленное воздействием СОЗ, сопровождается генерацией активных кислородных метаболитов: O_2^- , H_2O_2 , органических перекисей [8, 9], что, в свою очередь, приводит к гиперфункции свободных радикалов и, как следствие, к ослаблению защитных систем организма. В таких условиях происходит активация процессов ПОЛ в тканях гидробионтов [9-11]. Состояние клетки, возникающее в результате повышения содержания активных кислородных метаболитов, получило название окислительного стресса. Одним из показателей окислительного стресса и наличия активных кислородных метаболитов в клетке служит усиление процессов накопления продуктов ПОЛ, в частности, малонового диальдегида. Активация ПОЛ и накопление его продуктов может привести к увеличению вязкости биомембран, росту полярности микроокружения, истончению мембран – сокращению их гидрофобного объема, увеличению поверхностного отрицательного заряда, повышению проницаемости для ионов [12]. Эти нарушения структурных свойств мембран приводят к нарушениям их функциональных свойств, а также окислительной модификации макромолекул (белков, ДНК, РНК).



В условиях токсического действия ксенобиотиков данные процессы рассматриваются как ведущие патогенетические механизмы [9].

В процессе эволюции для защиты клеток от активных кислородных метаболитов у гидробионтов выработалась сложная многоуровневая антиоксидантная система – система ферментативных и неферментативных антиоксидантов. Ферментативное звено включает супероксиддисмутазу (СОД, КФ 1.15.1.1), катализирующую реакцию дисмутации O_2^- в перекись водорода, каталазу (КФ 1.11.1.6), разлагающую H_2O_2 , глутатион-зависимые пероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) и трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18), удаляющие гидроперекиси. Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, направленного против определенных форм активных кислородных метаболитов, специфичностью клеточной и органной локализации, специфичностью использования металлов в качестве катализаторов [13]. Следует отметить, что каталаза обладает бифункциональной активностью, поскольку может разлагать перекись водорода до воды и кислорода (каталазная реакция) и способна катализировать реакции окисления перекисью водорода разнообразных эндогенных и экзогенных субстратов (пероксидазное действие). Каталазная активность преобладает при высоких концентрациях H_2O_2 , пероксидазное действие регистрируется при низких уровнях перекиси в клетках [13-15].

Важную роль в защите организма от активных кислородных метаболитов играют низкомолекулярные антиоксиданты, особое место среди которых занимает глутатион [15]. Основной антиоксидантный эффект этого трипептида реализуется посредством

его участия в работе ферментативных антиоксидантов - будучи субстратом для ГПО и GST глутатион выступает донором атомов водорода для H_2O_2 и липидных перекисей. Также отмечено, что глутатион, конкурируя с СОД, может неэнзиматически взаимодействовать с супероксидным анионом и другими активными кислородными метаболитами [13].

Возможности антиоксидантной системы определяют устойчивость организма к действию экстремальных факторов среды, в том числе к загрязнению СОЗ [9]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что недостаток в организме тех или иных антиоксидантов приводит к интенсификации окислительных процессов в липидах и к появлению в них продуктов окисления в большем количестве, чем в норме. Механизмы антиоксидантной защиты и процессы ПОЛ при действии многих органических загрязнителей хорошо изучены у водных организмов [11,16-20].

Стойкие органические загрязнители водной среды

Большинство известных ксенобиотиков реализуют своё токсическое действие через механизмы ПОЛ [11]. Биомаркер присутствия чужеродных органических соединений должен реагировать только на их действие, большинство же биохимических показателей не соответствуют этому критерию. Так, например, баланс ПОЛ и антиоксидантной системы у рыб зависит от липидного состава тканей и их метаболической активности, а также от сезона, питания, возраста, жизненного цикла и естественной подвижности рыб [21]. Однако, учитывая влияние внутренних физиологических флуктуаций и действие



естественных абиотических факторов, с большой долей вероятности можно делать выводы о присутствии СОЗ в водоёме и влиянии их на гидробионтов по активности некоторых компонентов антиоксидантной и монооксигеназной систем и содержанию продуктов ПОЛ.

Индукторами рассматриваемого комплекса биохимических показателей являются несколько классов химических соединений. Полихлорированные дибензо-п-диоксины и полихлорированные дибензофураны – планарные хлорированные углеводороды, которые широко распространены в окружающей среде. Эти два класса представлены 75 и 135 конгенерами, соответственно. Наиболее токсичное соединение в этой группе – 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин. Следующая приоритетная группа ксенобиотиков – полихлорированные бифенилы (ПХБ), представленные 209 конгенерами. Снятые с производства во многих странах, они и по сей день циркулируют в природной среде благодаря своей устойчивости и способности к биоаккумуляции. Сильными индукторами среди конгенов являются ПХБ 77 (3,3', 4,4'-тетрахлоробифенил), ПХБ 126 (3,3',4,4', 5-пентахлоробифенил), ПХБ 169 (3,3',4,4', 5,5'-гексахлоробифенил). Полибромированные бифенилы и полихлорированные терфенилы являются структурными гомологами ПХБ и также представляют опасность для гидробионтов. Существенную долю поступающих в водоемы поллютантов составляют хлорорганические пестициды и полиароматические углеводороды (ПАУ). Несмотря на то, что существуют естественные источники поступления ПАУ в среду, загрязнение ими водных экосистем происходит, в основном, по вине человека [6].

Ключевые слова:
молекулярные
маркеры,
стойкие органические
загрязнители,
рыбы

Особенности применения биомаркерного подхода в экологическом мониторинге

Приблизиться к пониманию степени воздействия загрязнения на экосистему можно с помощью изучения резидентных популяций. Необходимо задуматься о выборе вида-индикатора. В качестве критерия может быть использована «экологическая» и (или) экономическая значимость вида в регионе исследования [22]. Выбранный вид должен удовлетворять одному из следующих условий: а) быть обильным в исследуемой и контрольной областях, б) быть легко адаптируемым к лабораторным условиям для проведения экспериментов с целью выявления базовых активностей биохимических показателей [23].

Водные объекты подвергаются загрязнению сложными смесями ксенобиотиков, как индукторами, так и ингибиторами маркерных структур, вследствие чего ответную реакцию организма трудно расшифровать. Одного биомаркера недостаточно для того, чтобы оценить тонкие сублетальные эффекты загрязнителей. Решением проблемы видится использование комплекса показателей [24, 25].

При выявлении биологических эффектов у рыб следует учитывать, что рассматриваемые биохимические показатели являются очень нестабильными и чувствительными к манипуляционным процедурам. Существует ряд приёмов для минимизации ошибок в полученных результатах. Важно быстро обрабатывать пойманную рыбу, так как стресс запускает выброс глюкокортикоидов (например, кортизола), что повышает уровни ЭРОД [26] и стимулирует ПОЛ, увеличивая содержание его продуктов. Органы от живой рыбы следует помещать в жидкий





азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) для хранения до аналитической процедуры. Приготовление гомогената ткани необходимо осуществлять в ледяном буфере и на льду.

Использование набора биомаркеров позволяет с большой вероятностью выявлять загрязняющие агенты и их соотношение в естественных экосистемах по силе ответной реакции организма, что позволяет проводить дорогостоящие химические анализы компонентов среды более целенаправленно [25].

Заключение

Таким образом, комплекс показателей, таких как активность компонентов антиоксидантной системы, ЭРОД, содержание продуктов ПОЛ в органах рыб можно успешно использовать в качестве индикатора присутствия СОЗ в среде их обитания.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-01168-а.

Литература

1. Лукьянова О.Н. Молекулярные биомаркеры. Владивосток: ДВГАЭУ, 2001. 196 с.
2. Довженко Н.В. Реакция антиоксидантной системы двустворчатых моллюсков на воздействие повреждающих факторов среды // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ДВГУ МОН РФ, 2006. 23 с.
3. Di Giulio R.T. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity / Di Giulio R.T., Benson W.H., Sanders B.M., Van Veld P.A. // Rand G.M. (ed.) Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate,

and risk assessment. Washington: Taylor & Francis, 1995. Ch. 17. P. 523–561.

4. Арчаков А.И. Оксигеназы биологических мембран. М.: Наука, 1983. 56 с.
5. Sarasquete C. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies / Sarasquete C., Segner H. // The Science of the Total Environment. 2000. V. 247. № 2–3. P. 313–332.
6. Whyte J.J. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure / Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E // Critical Reviews in Toxicology. 2000. V. 30. Is. 4. P. 347–570.
7. Ripp S.L. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes: Contrasting Roles in Detoxification and Bioactivation of Drugs and Xenobiotics // Elfarra A.A. (ed.) Advances in Bioactivation Research. 2008. P. 69–102.
8. Ляхович В.В. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Бюллетень СО РАМН. 2005. № 4 (118). С. 7-12.
9. Левина И.Л. Экологические аспекты токсичности азоловых пестицидов для гидробионтов / И.Л. Левина, Д.В. Москвичев, О.А. Зинчук Ростов-на-Дону: Медиа-полис, 2007. 180 с.
10. Саприн А.Н. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов / А.Н. Саприн, Е.В. Калинина // Успехи биологической химии. 1999. Т. 39. С. 289-326.
11. Di Giulio R.T. Reactive oxygen species and oxidative stress / Di Giulio R.T., Hinton D.E. // In: Di Giulio R.T., Hinton D.E. The toxicology of fishes. CRC Press: Taylor & Francis. 2008. Ch. 6. P. 273-324.
12. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков М.: Наука, 1972. 242 с.
13. Зенков Н.К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.
14. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора. М.: Мир, 1979. Т. 1, С. 272-314.
15. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. 1990. Т. 110, № 1. С. 20-33.
16. Руднева И.И. Действие полихлорированных бифенилов на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов в гона-

- дах черноморской султанки *Mullus Barbatulus Ponticus* / И.И. Руднева, Н.В. Жерко // Биология моря. 1999. Т. 25, № 3. С. 239-242.
17. Sole M. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol / Sole M., Porte C., Barcelo D. // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2000. № 38. P. 494-500.
18. Hamed R.R. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution / Hamed R.R., Farid N.M., Elowa Sh.E., Abdalla A.-M. // The Environmentalist. 2003. № 23. P. 313-322
19. Elia A.C. Polychlorinated biphenyls and antioxidant enzymes in liver of *Cyprinus carpio* from Lake Trasimeno / Elia A.C., Galarini R., Dörr A.J.M., Carnevali O., Fioroni L., Taticchi M.I. // Italian Journal of Zoology. 2005. V. 72. P. 1-7.
20. Srivastava A. Stereospecificity in the cytotoxic action of hexachlorocyclohexane isomers / Srivastava A., Shivanandappa T. // Chemico-Biological Interactions. 2010. № 183. P. 34-39.
21. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123, № 4. С. 391-400.
22. Hallare A.V. The versatile, changing, and advancing roles of fish in sediment toxicity assessment - a review / Hallare A.V., Seiler T.-B., Hollert H. // Journal of Soils and Sediments. 2011. Vol. 11. P. 141-173.
23. Piña B. Biological effects of chemical pollution in feral fish and shellfish populations from Ebro River: from molecular to individual level responses / Piña B., Raldúa D., Barata C., Faria M., Navarro A., Damasio J., Olivares A., Quirós L., Pelayo S., Casado M. // The Handbook of Environmental Chemistry. 2011. V. 13. P. 275-293.
24. Giesy J.P. Freshwater sediment toxicity bioassessment-rationale for species selection and test design / Giesy J.P., Hoke R.A. // J Great Lakes. 1989. V. 15. P. 539-569.
25. Mdegela R.H. Assesment of pollution in sewage pond using biomarker responses in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania / Mdegela R.H., Braathen M., Mosha R.D., Skaare J.U., Sandvik M. // Ecotoxicology. 2010. V. 19. P. 722-734.
26. Devaux A. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes / Devaux A., Pesonen M., Monod G., Andersson T. // Biochemistry and Pharmacology. 1992. V. 43. P. 898-901.



A.A. Morozov, V.V. Yurchenko

BIOCHEMICAL MARKERS FOR ASSESSMENT OF ORGANIC POLLUTANT IMPACT ON HYDROCOLE

Biochemical aspects of organism protective systems respond to xenobiotics have been investigated. The possibility of using a complex of molecular markers (indicators

of the antioxidant system, lipid peroxidation and enzyme activity of the first phase biotransformation of xenobiotics) for the study of fish biological effects caused by

persistent organic pollutants has been presented.

Key words: molecular markers, persistent organic pollutants, fish