

БИОЛОГИЯ

УДК 577.1:597

DOI: 10.21779/2542-0321-2020-35-2-94–103

М.М. Габибов, А.И. Рабаданова

Динамика содержания среднемолекулярных пептидов и активности пептид-гидролаз тканей разновозрастных карповых рыб при комбинированном действии солей тяжелых металлов

*Дагестанский государственный университет; Россия, 367001, г. Махачкала,
ул. М. Гаджиева, 43а; phiziologI@yandex.ru*

Приведены данные по влиянию смеси солей тяжелых металлов (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+}) на содержание среднемолекулярных пептидов (СМП), протеолитической и автолитической активности печени, почек, белых и красных мышц сеголеток и годовиков карпа (*Cyprinus carpio Linnaeus*).

При воздействии смеси солей тяжелых металлов нами отмечено повышение уровня СМП, протеолитической и автолитической активности во всех исследованных тканях сеголеток и годовиков карпа. Характер изменения уровня СМП и активности пептид-гидролаз зависил от возраста и времени экспозиции рыб в среде с токсикантами.

На 5-е сутки воздействия смеси солей тяжелых металлов значительное накопление СМП имело место в красных мышцах сеголеток и годовиков карпа. Экспозиция рыб в среде смеси тяжелых металлов до 15 суток приводила к дальнейшему накоплению СМП во всех исследованных тканях и больше всего в красных мышцах сеголеток и годовиков карпа.

На 5-е сутки воздействия смеси солей тяжелых металлов протеолитическая активность значительно возрастала у сеголеток в почках, автолиза – в белых мышцах, у годовиков протеолиза и автолиза – в печени. В данных условиях эксперимента изменением протеолитической активности в меньшей степени реагировали красные мышцы сеголеток и белые мышцы годовиков карпа, автолиза – красные мышцы сеголеток карпа.

На 15-е сутки воздействия смеси солей тяжелых металлов отмечалось дальнейшее повышение протеолитической и автолитической активности исследованных тканей. Значительное возрастание протеолиза имело место у сеголеток во всех органах, особенно в печени у годовиков – в красных мышцах, у автолиза – в почках сеголеток и красных мышцах годовиков карпа.

Ключевые слова: карп, тяжелые металлы, среднемолекулярные пептиды, пептид-гидролазная активность.

Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и их влияния на водных обитателей и человека является актуальной проблемой современности. Загрязнение водоемов тяжелыми металлами, к которым относятся свинец, кадмий, марганец и др., – один из самых распространенных видов техногенного прессинга [1–4]. В связи с этим в последние годы отмечается интерес исследователей к изучению токсического действия солей тяжелых металлов на организм гидробионтов [5–7].

Важным аспектом этой проблемы является изучение механизмов развивающегося патогенеза с учетом особенностей обмена веществ в теле рыб, поскольку известно, что при этом нарушаются процессы обмена веществ и прежде всего белкового [8]. Белки играют главную роль в жизнедеятельности и адаптационных процессах живых организмов. Одним из путей нарушения функций организма является возрастание протеолиза и окислительной модификации белков, которые вызываются активными формами кислорода и образуются во всех аэробных клетках [9–10]. Окислительно-модифицированные белки в десятки раз быстрее подвергаются протеолизу, чем нативные.

Кроме протеолиза, окислительно-модифицированные белки могут подвергаться спонтанной фрагментации [11]. Продуктами неполного протеолиза и окислительной модификации белков тканей являются среднемолекулярные пептиды (СМП), которые имеют молекулярную массу от 500 до 2000 Да. СМП, являясь продуктами распада белков, действуют как вторичные эндотоксины, вызывая расстройство различных физиологических процессов [12–16].

Нами проведено исследование содержания СМП, протеолитической и автолитической активности тканей сеголеток и годовиков карпа при комбинированном действии смеси солей тяжелых металлов.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования нами использована наиболее распространенная в аквакультуре промысловая рыба – карп (*Cyprinus carpio Linnaeus*). Рыб перевозили в специальных полиэтиленовых мешках с кислородом из Широкольского рыбоводного комбината Республики Дагестан в Махачкалу на биологический факультет Дагестанского государственного университета.

Рыбы помещались в аквариумы объемом 250 л. В каждом аквариуме содержалось в зависимости от возраста и размеров разное количество рыб: сеголеток – по 15–20, годовиков – по 8–10. В аквариумах создавали условия постоянных температурного и газового режимов. Постоянную аэрацию аквариумов создавали с помощью специальных аэраторов. В течение одного месяца рыбы проходили адаптацию в условиях аквариума, при которой часть рыб погибала. В эксперименте использовались выжившие рыбы.

В качестве токсикантов нами была использована смесь солей тяжелых металлов: ацетата свинца ($0,5 \text{ мг}/\text{дм}^3$, ПДК = $0,1 \text{ мг}/\text{дм}^3$), хлорида кадмия ($1 \text{ мг}/\text{дм}^3$, ПДК = $0,005 \text{ мг}/\text{дм}^3$) и сульфата марганца ($0,1 \text{ мг}/\text{дм}^3$, ПДК = $0,01 \text{ мг}/\text{дм}^3$). Экспозицию рыб в токсической среде тяжелых металлов проводили в течение 5 и 15 суток. В качестве контроля использовали рыб, которых содержали в аквариумах без добавления токсикантов.

Для исследования брали красные, белые мышцы, печень и почки рыб, в которых определяли содержание среднемолекулярных пептидов и активность пептид-гидролаз при нейтральном рН.

Определение количества среднемолекулярных пептидов проводили модифицированным методом Бебеля с соавт. [17]. О содержании СМП судили на основании прямой спектрометрии дегидратированного супернатанта, полученного после осаждения белков раствором трихлоруксусной кислоты при длине волны 254 нм. Результаты вы-

ражали в условных единицах, представляющих собой показатели оптической плотности при длине волны 254 нм до третьего знака после запятой.

Протеолитическую и автолитическую активность определяли при нейтральном pH (7,8) и температуре тела рыб (+23 °C) при инкубации 1 % гомогенатов тканей в течение 60 мин. Для определения протеолитической активности в качестве субстрата использовали 0,5% гемоглобин на трис-буфере [18]. При автолизе субстратами служили собственные белки тканей. Об активности пептид-гидролаз судили по накоплению тирозина в инкубационной среде, который определяли модифицированным методом [19]. Активность пептид-гидролаз выражали в мкмоль тирозина на мг белка.

Полученные данные подвергали вариационно-статистической обработке методом малой выборки [20]. При определении степени различия средних арифметических двух сравниваемых вариационных рядов вычисляли показатели существенности разницы t . Затем на основании t по таблице Стьюдента определяли вероятность различия p . При $p \leq 0,05$ и выше различие оценивается как достоверное (вероятность различия более 95 %). Построение диаграмм осуществляли при помощи пакета Excel 7.0.

Результаты и их обсуждение

Полученные нами результаты представлены в табл. 1, 2 и рис. 1–3. Из табл. 1 видно, что исследованные ткани контрольных сеголеток карпа содержали в среднем одинаковые количества СМП. В то же время их уровень в тканях годовиков в 1,2–2 раза выше по сравнению с сеголетками.

Таблица 1. Содержание среднемолекулярных пептидов (ед.) в тканях сеголеток и годовиков карпа при действии смеси солей тяжелых металлов ($M \pm m$; $n = 10$)

Условия опыта Ткани	Воздействие тяжелых металлов					
	Контроль		5 суток		15 суток	
	сеголетки	годовики	сеголетки	годовики	сеголетки	годовики
Печень	0,112±0,03	0,221±0,023	0,165±0,009*	0,304±0,015**	0,190±0,009*	0,324±0,021*
Почки	0,165±0,012	0,200±0,017	0,210±0,008*	0,252±0,032	0,255±0,032*	0,294±0,051*
Белые мышцы	0,162±0,017	0,267±0,03	0,221±0,04*	0,345±0,041*	0,270±0,061*	0,395±0,019*
Красные мышцы	0,134±0,012	0,202±0,023	0,234±0,021**	0,380±0,072*	0,280±0,032**	0,430±0,031**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

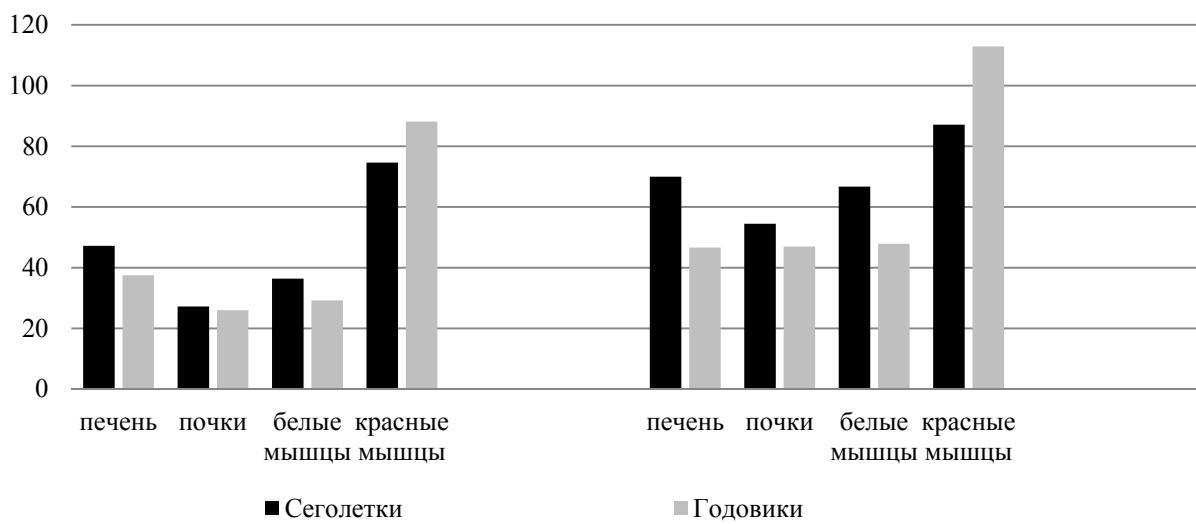


Рис. 1. Динамика содержания среднемолекулярных пептидов в тканях сеголеток и годовиков карпа в условиях комбинированного действия солей тяжелых металлов (по отношению к контролю, принятому за 100 %)

На 5-й день экспозиции рыб в среде с токсикантами во всех тканях сеголеток и годовиков карпа наблюдалось повышение уровня СМП. Значительное их накопление происходило в красных мышцах, затем в печени и почках сеголеток и годовиков карпа.

Пребывание рыб в среде с токсикантами в течение 15 суток приводило к дальнейшему накоплению СМП в тканях рыб. При этом сохранялась тканевая специфика, отмеченная нами на предыдущем этапе исследования. Так, наиболее интенсивное накопление СМП наблюдалось в скелетных мышцах сеголеток и годовиков карпа, уровень которых в красных мышцах повышен по сравнению с контролем в 2,1 раза, в белых мышцах – на 66,7 и 47,9 % соответственно. В печени у годовиков карпа содержание СМП повышенено на 46,6 %, у сеголеток – на 70,0 %. Прирост содержания СМП имел место и в почках сеголеток и годовиков карпа (соответственно на 54,5 и 47,0 %).

Таким образом, во всех исследованных тканях сеголеток и годовиков карпа значительное накопление СМП наблюдалось при экспозиции рыб в среде со смесью тяжелых металлов в течение 15 суток по сравнению с их экспозицией в течение 5 суток. Повышение уровня СМП может быть связано с нарушением их элиминации из организма, усилением образования в тканях либо сочетанием обоих механизмов.

Известно, что одной из причин накопления СМП в тканях является ограниченный протеолиз модифицированных белков [13]. Нами изучено влияние смеси тяжелых металлов на протеолитическую и автолитическую активность тканей сеголеток и годовиков карпа. Полученные результаты свидетельствуют, что характер изменения активности пептид-гидролаз зависел от возраста и времени действия токсикантов на организм рыб (табл. 2; рис. 2, 3).

На 5 и 15-е сутки воздействия смеси солей тяжелых металлов у сеголеток и годовиков карпа имело место повышение протеолитической и автолитической активности исследованных тканей.

На 5-е сутки воздействия смеси солей тяжелых металлов значительнее всего повышение протеолитической активности выражено у сеголеток в почках (на 58,5 % выше контроля), автолиза – в белых мышцах (на 55,6 % выше контроля). В меньшей степени увеличением активности протеолиза и автолиза реагировали красные мышцы сеголеток (на 22,4 % выше контроля) и годовиков (на 19,3 % выше контроля) карпа.

Таблица 2. Протеолитическая и автолитическая активность (мкмоль тирозина/мг белка/60 мин) тканей сеголеток и годовиков карпа в условиях комбинированного действия солей тяжелых металлов ($M \pm n$; $n = 10$)

Условия опыта Ткани	Воздействие тяжелых металлов					
	Контроль		5 дней		15 дней	
	сеголетки	годовики	сеголетки	годовики	сеголетки	годовики
Протеолиз						
Печень	0,210±0,012	0,280±0,041	0,280±0,024*	0,423±0,052**	0,380±0,08**	0,450±0,045**
Почки	0,053±0,002	0,088±0,009	0,084±0,007**	0,121±0,007*	0,091±0,004*	0,135±0,008**
Белые мышцы	0,052±0,004	0,073±0,005	0,075±0,005	0,091±0,004*	0,089±0,003*	0,096±0,006*
Красные мышцы	0,143±0,031	0,166±0,022	0,175±0,012	0,285±0,012**	0,196±0,022*	0,325±0,014***
Автолиз						
Печень	0,190±0,034	0,220±0,012	0,250±0,006*	0,301±0,014*	0,289±0,008*	0,363±0,032**
Почки	0,043±0,008	0,058±0,007	0,063±0,001*	0,075±0,007*	0,084±0,004***	0,094±0,006**
Белые мышцы	0,045±0,003	0,064±0,003	0,070±0,002**	0,087±0,008*	0,082±0,005***	0,093±0,008**
Красные мышцы	0,123±0,021	0,145±0,022	0,162±0,012	0,173±0,023*	0,180±0,071*	0,269±0,033***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

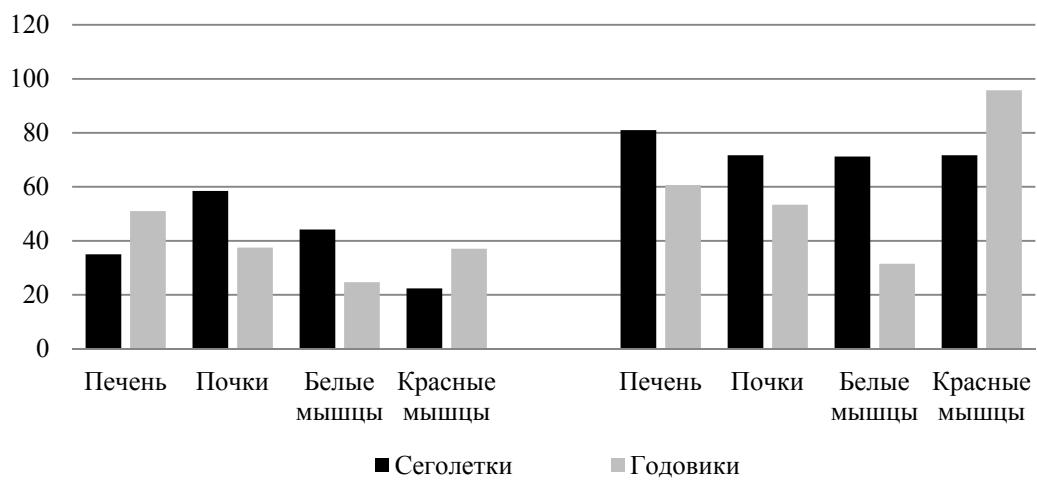


Рис. 2. Динамика протеолитической активности тканей сеголеток и годовиков карпа в условиях воздействии смеси солей тяжелых металлов (по отношению к контролю, принятому за 100 %)

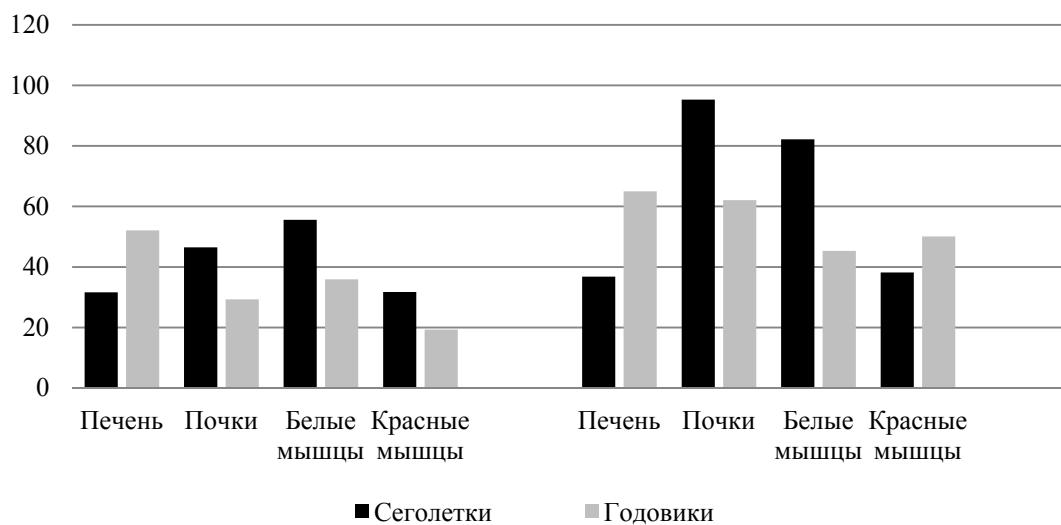


Рис. 3. Динамика автолитической активности тканей сеголеток и годовиков карпа при действии смеси солей тяжелых металлов (по отношению к контролю, принятому за 100 %)

На 15-е сутки экспозиции рыб в токсической среде солей тяжелых металлов также отмечалось выраженное повышение протеолитической и автолитической активности всех исследованных тканей разновозрастных карповых рыб. Значительнее всего повышалась протеолитическая активность у сеголеток карпа в печени (на 81,0 %), у годовиков – в красных мышцах (на 95,8 %), автолиза – в почках (на 95,3 %) сеголеток и в красных мышцах (на 87,6 %) годовиков карпа. На основании полученных данных можно заключить, что увеличение протеолитической и автолитической активности в тканях сеголеток и годовиков карпа в условиях действия смеси солей тяжелых металлов коррелирует с накоплением СМП в заданных условиях эксперимента.

Наряду с повышением активности протеолитических ферментов причиной увеличения уровня СМП в тканях сеголеток и годовиков карпа может быть накопление продуктов свободнорадикального окисления липидов [10].

Интенсификация процессов модификации белков, увеличение содержания СМП, являющихся маркерами эндогенной интоксикации, при одновременном повышении активности протеолитических ферментов тканей разновозрастных карповых рыб могут свидетельствовать о развитии процессов повреждения в их организме.

Среднемолекулярные пептиды обладают высокой биологической и нейротоксической активностью, угнетают процессы синтеза белка, разобращают процессы окисления и фосфорилирования, подавляют эритропоэз и фагоцитоз [14]. Они ингибируют гликозилаз, гликонеогенез, пентозный цикл, нарушают тканевое дыхание, мембранный транспорт ионов, угнетают активность Na^+ , K^+ -АТФазы. Различные фракции СМП обладают как антиоксидантными, так и прооксидантными свойствами [13]. Многие компоненты СМП, особенно выделенные из крови больных с хронической почечной недостаточностью и генитальным герпесом, а также обожженных, обладают токсическим действием [12, 21].

Однако многие пептиды, входящие в эту фракцию, являются биологически активными и участвуют в регуляции обмена веществ. При этом выяснилось, что направленность и выраженность эффекта зависит от молекулярной массы пептида. При внутривенном введении крысам они либо потенцировали стресс-реакцию, либо угнетали ее. Среднемолекулярные пептиды, выделенные из тимуса, эпифиза и костного мозга, способствовали увеличению средней продолжительности жизни и обладали противоопухолевой активностью [22]. На основе пептидов рыб синтезированы фармакологические препараты и биоактивные добавки к пище. Отсюда следует, что суммарный эффект СМП зависит от их состава.

Таким образом, накопление СМП в результате спонтанной фрагментации белков и повышения активности протеолитических ферментов при загрязнении водной среды солями тяжелых металлов отражает состояние токсического стресса, которому подвержены, как показывают полученные нами данные, сеголетки и годовики карпа.

Содержание СМП и активность протеолитических ферментов могут быть использованы в качестве биомаркеров оценки влияния на рыб меняющихся условий среды, и их регуляторная функция представляет большую значимость при адаптации процессов обмена к условиям среды обитания.

Литература

1. Леонова Г.А. Биогеохимическая индикация загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами // Водные ресурсы (качество и охрана вод, экологические аспекты. – 2004. – Т. 31, № 2. – С. 215–334.
2. Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В., Селиваненко Н.Г., Шафрам Л.М. Токсикология тяжелых металлов – облигатных контаминаントов природных вод. – 2002. <http://www.ecologylife.ru/voda-i-zdoroje-2002/toksikologiya-tyazhyolyih-metallov-%E2%80%99.html>

3. Голованова И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биология внутренних вод. – 2008. – № 1. – С. 99–108. <http://www.maikonline.com/maik/showarticle.do?aid=vafcvu21du&lang=ru>
4. Moiseenko T.I. Bioavailability and ecotoxicity of metals in aquatic: critical levels of pollution // Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry RAN. – 2019. – Vol. 64, № 7. – Р. 675–688. <http://journals.eco-vector.com/0016-7525/article/view/15320>
5. Артамонов Ю.В., Евлампиева Е.П., Артамонова Е.Н. Свинец в промысловых рыбах реки Иртыш // Молодой ученый. – 2017. – № 6. – С. 4–6. <http://moluch.ru/archive/140/39364/>
6. Беляева А.А., Кутлин Н.Г. Тяжелые металлы в органах и тканях рыб реки Белой // Совр. проблемы науки и образования. – 2017. – № 6. <http://science-education.ru/article/view?id=27245>
7. Бурдина Н.Ф. Анализ особенностей накопления и распределения тяжелых металлов в организме рыб (обзор литературы) // Молодой ученый. – 2019. – Т. 40. – С. 183–185. <http://moluch.ru/archive/278/62745/>
8. Лапирова Т.Б. Реакция показателей белкового и углеводного обмена рыб на воздействие кадмия (обзор) // Труды института биологии внутренних вод РАН. – 2017. – № 77 (80). – С. 77–91.
9. Руднева И.И. Эколо-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи соврем. биол. – 2003. – Т. 123, № 4. – С. 391–400.
10. Рабаданова А.И., Габибов М.М., Абдуллаева Н.М., Ахмедова А.Д., Сулейманова Ж.А. Оксидативный стресс как показатель функционального состояния рыб при загрязнении водной среды тяжелыми металлами // Материалы Региональной научно-практич. конф. «Актуальные проблемы химической науки и образования». – Махачкала, 2016. – С. 306–309.
11. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. и др. Окислительная модификация белков крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) // Вопросы мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 4. – С. 393–409.
12. Владыка Л.С., Левицкий Э.Р., Поддубный Л.П., Габриелян Н.М. Средние молекулы и проблемы эндогенной интоксикации при критических состояниях различной этиологии // Анестезиол. и реаниматол. – 1987. – № 2. – С. 37–42.
13. Волчегорский И.А., Костин Ю.К., Скобелева Н.И. «Средние молекулы» как эндогенные модуляторы стресса // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1994. – № 4. – С. 23–26.
14. Semenenko M.P., Kuzminova E.V., Tyapkina E.V., Abramov A.A., Semenenko K.A. Molecules of Medium Mass as an integral indicator of endogenous intoxication in the diagnosis of Hepatopathy and its effect on improving the economic efficiency of veterinary measures in the field of dairy farming // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (JPSR). – 2017. – Vol. 9 (9). – Р. 1573–1575.
15. Борицкова Т.И., Епифанцева Н.Н., Лызлов А.Н., Кан С.Л., Додонов М.В. Динамика спектра среднемолекулярных пептидов при тяжелой черепно-мозговой травме // Медицина в Кузбассе. – 2018. – Т. 17, № 4. – С. 62–68.

16. Абрамов А.А., Семененко М.П., Кузьминова Е.В., Гринь В.А. Изучение уровня среднемолекулярных пептидов в сыворотке крови лабораторных крыс при фармакотерапии острого токсического гепатита // Сборник научных трудов Краснодарского научного центра по зоотехнии и ветеринарии. – 2019. – Т. 8. – № 2. – С. 232–236.
17. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск, 2007. – С. 171–452.
18. Габибов М.М., Рабаданова А.И. Возрастная динамика пептид-гидролазной активности тканей карповых рыб // Вестник Дагестанского государственного университета. Сер.: Естественные науки. – 2018. – Т. 33, вып. 2. – С. 74–80.
19. Lowry J., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265–275.
20. Калинина В.Н., Панкин В.Ф. Математическая статистика. – М.: Дрофа, 2003. – 336 с.
21. Камбачокова З.А., Шогенова М.С. Состояние уровня среднемолекулярных пептидов в плазме кро ви у больных генитальным герпесом // Вестник новых мед. технологий: электронный журнал. – 2018. – № 2. – С. 21–24. <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018 -2/1-4. hdf>
22. Хавинсон В.Х., Анисимов С.В., Малинин В.В., Анисимов В.Н. Пептидная регуляция генома и старения. – М.: РАМН, 2005. – 208 с.

Поступила в редакцию 16 февраля 2020 г.

UDC 577.1:597

DOI: 10.21779/2542-0321-2020-35-2-94–103

Dynamics of the Molecular Weight Peptides and Peptide Hydrolase Activity in Tissues of Cyprinid Fish of Different Ages under the Combined Action of Heavy Metals Salts

M.M. Gabibov, A.I. Rabadanova

*Dagestan State University; Russia, 367001, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a;
phiziolog1@yandex.ru*

The data on the effect of a mixture of heavy metals salts (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+}) on the content of medium-molecular peptides (SMP), proteolytic and autolytic activity of the liver, kidneys, white and red muscles of juvenile and yearling carp (*Cyprinus carpio Linnaeus*) are presented.

When exposed to a mixture of heavy metals salts, the increase in the level of SMP, proteolytic and autolytic activity in all studied tissues of juvenile and yearling carp is observed. The nature of changes in the level of SMP and activity of peptide hydrolases depended on the age and time of exposure of fishes in the environment with toxicants.

On the 5th day of exposure to a mixture of salts of heavy metals, a significant accumulation of SMP occurred in the red muscles of juvenile and yearling carp. Exposure of fish in the medium of a

mixture of salts of heavy metals for up to 15 days led to further accumulation of SMP in all studied tissues and most of all in the red muscles of juvenile and yearling carp.

On the 5th day of exposure to a mixture of salts of heavy metals, proteolytic activity increased significantly in fingerlings in the kidneys, autolysis – in white muscles, in yearlings proteolysis and autolysis – in liver. Under these experimental conditions proteolytic activity in the red muscles of fingerlings and white muscles of yearlings, autolysis – in red muscles of yearlings reacted less.

On the 15th day of exposure to a mixture of salts of heavy metals, there was a further increase in the proteolytic and autolytic activity of the studied tissues. This considerable increase in proteolysis was observed at fingerlings – in all investigated organs, particularly in liver, yearlings – in the red muscle, autolysis – in kidneys of fingerling and red muscles of carp yearlings.

Keywords: *carp, heavy metals, medium-molecular peptides, peptide-hydrolase activity*

Received 16 February 2020