

УДК 577.112:001.36:597.55:544.638.3:574.64

## **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ МОРСКОГО ЕРША, ОБИТАЮЩЕГО В БУХТАХ С РАЗЛИЧНЫМ АНТРОПОГЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ**

*Королева А. В., Залевская И. Н.*

*Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь,  
anna.undymiel@gmail.com, inz3@mail.ru*

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучали белковый состав мышечной ткани и печени морского ерша (*Scorpaena porcus*), отловленного в бухтах Севастополя с разным уровнем загрязнения. Были отмечены различия между электрофоретическими спектрами белков мышечной ткани и печени особей из бухт с разным уровнем антропогенной нагрузки. Эти различия проявились в изменении электрофоретической подвижности, в распределении белковых фракций по электрофоретическим зонам и в их гетерогенности. Качественные характеристики подтверждены статистическому анализу. Обсуждается вопрос о возможности использования электрофоретических спектров белков мышечной ткани для оценки влияния антропогенных факторов на водные организмы.

*Ключевые слова:* морской ерш, электрофоретические спектры, белки, мышечная ткань, печень, антропогенные факторы, загрязнение.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время для анализа состояния водных экосистем, подвергающихся интенсивному антропогенному воздействию, важно не только знать содержание загрязнителей в воде, грунтах и биоте, но и определять отклики гидробионтов на действие этих загрязнителей. Воздействие множества антропогенных факторов выдвигает на первый план проблему методов оценки их влияния на водные организмы [1]. Для определения влияния химических загрязнителей на организм необходимо проанализировать не только их содержание в воде, но и установить ответные реакции организма на действие этих факторов. Биоиндикация (методика оценки экологического состояния окружающей среды по реакциям обитающих в ней биологических систем) имеет ряд преимуществ перед гидрохимическими и химико-аналитическими методами исследования, а именно: эта методика неспецифична и весьма чувствительна к низким концентрациям токсикантов [2]. Оценка отрицательного влияния загрязняющих веществ на морские организмы производится по комплексу биологических показателей, среди которых существенное место отводится биохимическим параметрам. Изменения этих параметров могут быть основой для выявления наиболее уязвимых физиологических процессов, происходящих в организме, что позволяет использовать изученные показатели для разработки критериев ранней диагностики отравления живых объектов [3].

В последнее время для оценки повреждающего действия ксенобиотиков на организмы используются биомаркеры «присутствия», отклики которых свидетельствуют о наличии в воде токсикантов и характеризуют неблагоприятное действие последних на организм [4].

Известно, что рыбы, как верхнее трофическое звено водной экосистемы, являются индикаторами загрязнения и по изменению их физиолого-биохимического состояния можно оценивать и прогнозировать последствия наличия токсических веществ в воде [5].

Установлено, что наследственные особенности организма имеют непосредственное отражение в белковом составе различных тканей. Белки при этом являются фенотипическими признаками, хотя они значительно лучше отражают особенности генотипа, чем любые морфологические признаки, так как полипептиды – это первичные продукты реализации наследственной информации. Особенно ярко проявляются наследственные признаки в тех белковых системах, которые отличаются высокой полиморфностью. Такие системы могут быть использованы как биохимические тесты для оценки состояния организмов [6].

Существует предположение, что белковый полиморфизм тканей рыб связан с состоянием среды их обитания. Наибольший интерес представляет изучение белков печени и мышц рыб, так как в мышечной ткани накапливаются токсические соединения (тяжелые металлы, нефтепродукты), а в печени происходит детоксикация соединений, отравляющих организм.

Известно, что мышцы донных видов рыб, в большей степени по сравнению с другими экологическими группами рыб, способны аккумулировать тяжелые металлы, хлорорганические соединения и другие загрязняющие вещества. В частности, у биомониторного вида морского ерша, обнаружена наибольшая протеолитическая активность лизосом в мышечной ткани, отражающая степень загрязнения акватории [9]. В последнее время все больше накапливается данных о проявлении генетически детерминированного полиморфизма белков и установлены дискретные электрофоретические варианты отдельных белковых фракций. Вместе с тем, не исключается возможность постсинтетического образования конформационных изомеров белков, например, в результате комплексообразования с низкомолекулярными загрязняющими веществами и изменения, в силу этого, электрофоретической подвижности белков [6, 10, 11].

Таким образом, наибольший интерес представляет изучение особенностей электрофоретического состава тканевых белков донных рыб, обитающих в акваториях с разной степенью загрязненности.

Целью данных исследований является осуществление сравнительного анализа электрофоретического состава белков мышечной ткани и печени морского ерша, обитающего в черноморских бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования был выбран донный вид рыб – морской ерш – *Scorpaena porcus* (L.). Данный вид полностью отвечает требованиям,

предъявляемым к биомониторным объектам: повсеместное распространение в водоеме, хорошо изученная биология, не совершает длительных миграций [1]. Материалом исследования служили гомогенаты мышечной ткани и печени морского ерша.

Исследования проводили у рыб, отловленных в двух Севастопольских бухтах: Карантинной и Мартыновой, в апреле 2009 г. Эти бухты подвергаются различной антропогенной нагрузке. Согласно данным Государственной инспекции по охране Черного моря показано, что Карантинная бухта испытывает больший антропогенный прессинг; в Мартыновой бухте находится аварийный сток. В Карантинной бухте отмечено менее интенсивное судоходство, чем Мартыновой. В акватории Карантинной бухты выявлено наибольшее содержание нефтепродуктов, СПАВ, некоторых тяжелых металлов и других загрязняющих веществ, которые распределяются по всей территории, оседают в грунтах и аккумулируются в гидробионтах [1].

Фракционный состав белков изучали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле [7]. Окрашивание электрофореграмм проводили 1%-ным раствором амидочерного 10В в 7%-ной уксусной кислоте. Стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры) рассчитывали с учетом относительной электрофоретической подвижности фракций [8]. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы «EXCEL».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате наших исследований получены среднестатистические электрофоретические спектры белков гомогенатов мышц и печени морского ерша.

**Изучение электрофоретического состава белков мышечной ткани морского ерша в зависимости от антропогенной нагрузки.** Проведенные исследования показали, что среднестатистические электрофоретические спектры белков мышечной ткани морского ерша, обитающего в двух разных бухтах, содержат различное количество фракций: Карантинная – 24, Мартынова – 18.

Известно, что к водорастворимым мышечным белкам относятся белки группы миогенов (миоальбумины, глобулин Х и т.д.), а истинно сократительные белки, такие как актин и миозин, растворяются в средах с высокой концентрацией солей ( $\mu=0,6$  и больше), поэтому в полученных мышечных гомогенатах присутствовали главным образом белки первой группы [12].

В общей картине электрофоретических спектров белков мышечной ткани морского ерша, отловленного в различных бухтах, отмечены определенные различия. Наиболее подвижной и яркой анодной фракцией миоальбуминовой зоны оказалась фракция среднестатистического белкового спектра особей, обитающих в Карантинной бухте ( $K_{\text{ЭФ}} = 0,82-0,87$ ) (рис. 1). Миоальбуминовая фракция особей из Мартыновой бухты ярко не выражена, а ее подвижность составила 0,84. В Карантинной бухте обитают скорпены с наиболее гетерогенной зоной преальбуминов в ЭФ-спектре (4 фракции), у особей из Мартыновой – 2 фракции (табл. 1, рис. 1). Наиболее гетерогенная постальбуминовая зона отмечена у особей,

обитающих в Карантинной бухте (5 фракций). В ЭФ-спектрах обеих групп морских ершей выявлена гетерогенность посттрансферриновой зоны (5–6 фракций). А наибольшая гетерогенность предстартовой зоны отмечена в ЭФ-спектрах у особей, обитающих в Мартыновой бухте.

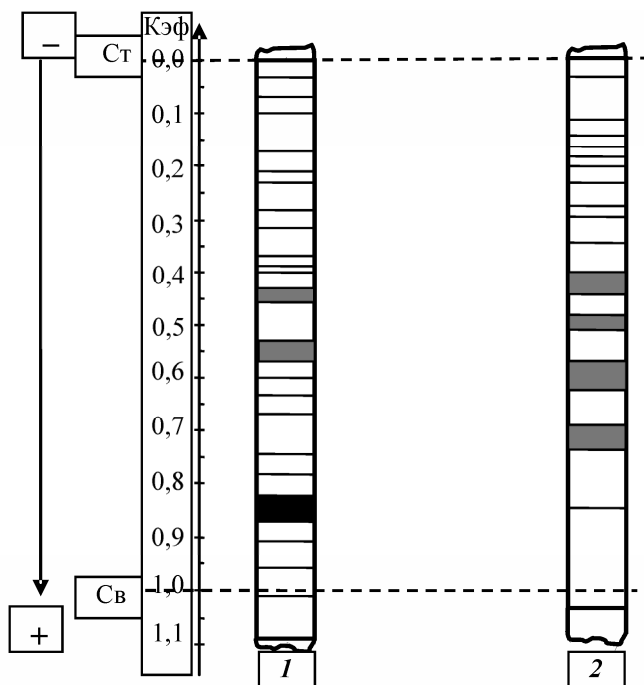


Рис. 1. Электрофоретические спектры белков мышечной ткани морского ерша, отловленного в Карантинной (1) и Мартыновой (2) бухтах  
Кэф – коэффициент относительной электрофоретической подвижности; Св – свидетель; Ст – старт; стрелкой обозначено направление миграции белков при электрофорезе.

*Таблица 1*

Распределение фракций в электрофоретических спектрах мышечных белков морского ерша

Зоны ЭФ-подвижности	Пределы Кэф белковых фракций	Количество фракций в ЭФ-спектрах	
		Карантинная бухта	Мартынова бухта
Преальбуминовая	1,1 – 0,90	4	1
Миоальбуминовая	0,90 – 0,80	1 (я)	1
Постальбуминовая	0,80 – 0,60	5	1 (я), 1 (п)
Трансферриновая	0,60 – 0,40	3	1 (п), 2
Посттрансферриновая	0,40 – 0,20	6	5
Предстартовая	0,20 – 0,00	5	7

Примечания к таблице: я – яркая фракция, п – пограничная фракция.

Изучение статистических показателей ЭФ-спектров выявило различные пределы числа электрофоретических фракций ( $n$ ) в спектрах белков мышечной ткани рыб, обитающих в разных бухтах. Минимальное количество фракций в спектре отмечено у особей, обитающих в Мартыновой бухте (8), а максимальное – у особей из Карантинной (17) (табл. 2).

Таблица 2

Статистические показатели электрофоретических спектров белков мышечной ткани особей морского ерша, отловленных в бухтах Севастополя

Наименование бухт	Показатели						
	Количество белковых фракций				Пределы Кэф		Cv, %
	min	max	M±m	$\sigma$	min	max	
Карантинная	11	17	14,0±0,33	2,48	0,00	1,15	16
Мартынова	8	14	11,13±0,56	4,44	0,00	1,02	19

Примечание к таблице: Cv – коэффициент вариации.

У скорпен, обитающих в Карантинной бухте, выявлено большее среднее количество фракций в спектрах (14,0±0,33), чем у рыб из Мартыновой (11,13±0,56). В ходе статистической обработки данных отмечались различные пределы относительной электрофоретической подвижности (Кэф) белковых фракций мышечной ткани скорпен, обитающих в разных бухтах. Так, этот показатель у особей из Карантинной бухты составил 0,00–1,15; из Мартыновой – 0,00–1,02. Как видно, большая электрофоретическая подвижность белковых фракций наблюдается у скорпен из Карантинной бухты. При вычислении коэффициента вариации (Cv) оказалось, что белковые спектры рыб из Мартыновой бухты обладают наибольшим варьированием (40%), а у особей из Карантинной бухты проявилось среднее варьирование белковых спектров (18%). Следует отметить, что варьирование считается слабым при Cv до 10%, при Cv=11–25% – среднее варьирование, а если Cv>25% – сильное [13]. При сравнении среднестатистических электрофоретических спектров белков мышечной ткани рыб, обитающих в разных бухтах, выяснилось, что они подобны. Белковые спектры скорпен из Карантинной и Мартыновой бухты имеют значительный коэффициент подобия– 82% [14].

Мартынова бухта является менее загрязненной, чем Карантинная. В среднестатистическом электрофоретическом спектре белков мышечной ткани скорпен, обитающих в Мартыновой бухте, отмечено меньшее количество фракций, низкая относительная электрофоретическая подвижность, слабо выраженный миоальбумин, менее гетерогенные преальбуминовые и трансферриновые зоны. Естественно, все это может привести к значительному варьированию электрофоретических фракций. Такие особенности белкового спектра мышечной ткани морского ерша из Мартыновой бухты могут быть связаны с наименьшим антропогенным прессингом в этой бухте по сравнению с Карантинной. Однако высокий коэффициент подобия все же подтверждает безусловное генетическое родство этих особей, а различия в белковых спектрах могут быть связаны с посттрансляционными изменениями белков мышечной ткани. Эти изменения могут

происходить в связи с различным уровнем загрязнения этих акваторий или спонтанным мутагенезом, вызванным химическими мутагенами.

**Изучение электрофоретического состава белков печени морского ерша, обитающего в бухтах с разным уровнем загрязнения.** Проведенные исследования также показали, что среднестатистические электрофоретические спектры белков печени морского ерша, обитающего в двух разных бухтах, содержат разное количество фракций: Карантинная – 14, Мартынова – 15 (рис. 2).

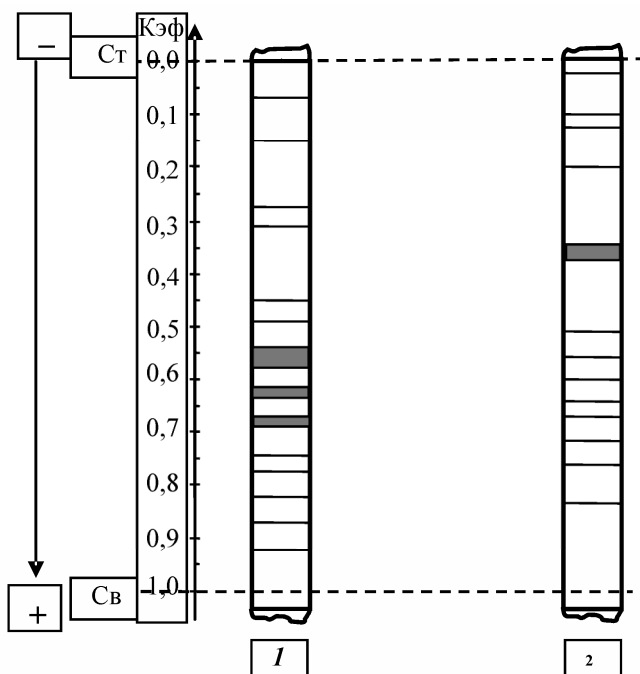


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков печени морского ерша, отловленного в Карантинной (1) и Мартыновой (2) бухтах

Кэф – коэффициент относительной электрофоретической подвижности; Св – свидетель; Ст – старт; стрелкой обозначено направление миграции белков при электрофорезе.

В общей картине электрофоретических спектров белков печени морского ерша, отловленного в различных бухтах, отмечены определенные различия. В миоальбуминовой зоне ЭФ-спектра особей из Карантинной бухты выявлены 2 белковые фракции ( $Kэф=0,82$  и  $0,87$ ), а у особей из Мартыновой бухты – 1 ( $Kэф=0,83$ ) (рис. 2).

В преальбуминовой зоне электрофоретического спектра белков печени скорпен из Мартыновой бухты белковых фракций не обнаружено, у особей из Карантинной бухты отмечена одна фракция этой зоны (рис. 2, табл. 3). Постальбуминовая зона среднестатистического электрофоретического спектра белков печени морского ерша, отловленного в Карантинной бухте, содержит в себе 4 фракции, а у особей из

Мартыновой в этой же зоне – 5. Также отмечено большее количество фракций в трансферриновой зоне ЭФ-спектра белков печени морских ершей из Карантинной бухты (3), чем у особей из Мартыновой (2). В посттрансферриновой зоне ЭФ-спектров обеих групп рыб выявлено одинаковое количество фракций (2).

Таблица 3

Распределение фракций в электрофоретических спектрах белков печени морского ерша

Зоны ЭФ-подвижности	Пределы Кэф белковых фракций	Количество фракций в ЭФ-спектрах	
		Карантинная бухта	Мартынова бухта
Преальбуминовая	1,1 – 0,90	1	0
Миоальбуминовая	0,90 – 0,80	2	1
Постальбуминовая	0,80 – 0,60	4	5
Трансферриновая	0,60 – 0,40	3	2
Посттрансферриновая	0,40 – 0,20	2	2
Предстартовая	0,20 – 0,00	3	4

Изучение статистических показателей ЭФ-спектров выявило различные пределы числа электрофоретических фракций (n) в спектрах белков печени рыб, обитающих в разных бухтах. Минимальное и максимальное количество фракций в белковом спектре отмечено у особей, обитающих в Мартыновой бухте: 6 и 15 фракций (табл. 4).

Таблица 4

Статистические показатели электрофоретических спектров белков мышечной ткани особей морского ерша, отловленных в бухтах Севастополя

Наименование бухт	Изученные показатели						
	Количество белковых фракций				Пределы Кэф		Cv,%
	min	max	M±m	σ	min	max	
Карантинная	8	13	10,67±0,44	1,73	0,00	0,98	16
Мартынова	6	15	10,2±0,52	2,46	0,00	0,93	24

Примечание к таблице: Cv – коэффициент вариации.

Среднее число фракции (M±m) электрофоретических спектров обеих групп рыб различается в пределах доверительного интервала. Электрофоретические спектры белков печени особей из Мартыновой бухты имеют меньшие пределы относительной электрофоретической подвижности (Кэф=0,00–0,93) по сравнению с аналогичными показателями у особей из Карантинной (Кэф=0,00–0,98), однако эти различия незначительны. При вычислении коэффициента вариации (Cv) оказалось, что белковые спектры рыб из Мартыновой бухты обладают большим варьированием (24%), чем у особей из Карантинной бухты (16%). При сравнении среднестатистических электрофоретических спектров белков печени рыб, обитающих в разных бухтах, выяснилось, что они подобны. Белковые спектры

печени скорпен из Карантинной и Мартыновой бухт имеют достаточно высокий коэффициент подобия – 72% [14].

## **ВЫВОДЫ**

1. Установлены различия в электрофоретических спектрах белков мышечной ткани морского ерша в зависимости от уровня и типа антропогенной нагрузки. Это проявилось в различном распределении белковых фракций в ЭФ-спектрах, разной гетерогенности белковых зон, а также в большем количестве фракций и большей электрофоретической подвижности мышечных белков рыб, обитающих в более загрязненной акватории. Качественные характеристики подтверждены статистическим анализом.

2. Выявлены особенности электрофоретических спектров белков печени морского ерша, обитающего в бухтах с разным уровнем загрязнения, которые заключаются в различном распределении белковых фракций в ЭФ-спектрах, в большем количестве белковых фракций и в большей электрофоретической подвижности белков печени рыб из более загрязненной бухты, а также в отсутствии белковых фракций преальбуминовой зоны среднестатистического ЭФ-спектра скорпен, отловленных в менее загрязненной акватории. Качественные характеристики подтверждены статистическим анализом.

3. Изучение особенностей белковых спектров мышечной ткани рыб может способствовать оценке физиолого-биохимического состояния рыб и среды их обитания.

## **Список литературы**

1. Руднева И. И. Комплексная оценка качества водной среды с помощью биомаркеров разного уровня. / И. И. Руднева, Н. Ф. Шевченко, Л. С. Овен, И. Н. Залевская., Е. Н. Скуратовская // Актуальные вопросы водной токсикологии. – 2004. – С. 124–145.
2. Филенко О. Ф. Задачи и приемы биотестирования токсичности водной среды / О. Ф. Филенко // Методы биотестирования качества водной среды. – М.: Из-во МГУ, 1989. – С. 3–9.
3. Мензорова Н. И., Применение ДНКазы из эмбрионов морского ежа в качестве биотеста загрязнения морской воды различными токсикантами / Н. И. Мензорова, В. А. Рассказов // Биология моря. – Т. 25, №1. – С. 60–65.
4. Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. И. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 215 с.
5. Моисеенко Т. И. Экотоксикологический подход к оценке качества вод / Т. И. Моисеенко // Водные ресурсы. – 2005. – Т. 32, № 2 – С. 184–195.
6. Соркина Д. А. Полиморфизм белков сыворотки крови у гибридных животных / Д. А. Соркина // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1983. – № 4 (319). – С. 96–100.
7. Маурер Г. Диск-электрофорез / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971. – 200 с.
8. Соркина Д. А. Сравнительная характеристика белковых и липопротеидных спектров сыворотки крови черноморских рыб / Д. А. Соркина, И. И. Руднева // Труды КМИ. – 1975. – Т. 66, вып. 1. – С. 61–63.
9. Подунай Ю. А. Экологические особенности изменения некоторых показателей белкового обмена в мышечной ткани черноморских рыб / Ю. А. Подунай, И. Н. Залевская, И. Н. Руднева // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 19. – С. 184–190.



10. Мусаев Б. С. Влияние хронической интоксикации ацетатом свинца на фракционный состав белков и некоторые показатели липидного обмена скелетных мышц сеголеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) / Б. С. Мусаев, Г. Р. Мурадова, А. И. Рабаданова, С. О. Абдулаева, А. В. Курбетова, А. Б. Омарова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2009. – Т. 11, № 1(2). – С. 110–113.
11. Солонченко А. И. Систематическое положение цестоды «*Bohricephalus scorpii*» от камбал Черного и Азовского морей и ее генетический вариации / А. И. Солонченко, И. И. Руднева // Экология моря. – 1997. – Вып. 46. – С. 75–77.
12. Смирнов Л. П. Сравнительная оценка белковых спектров печени и мускулатуры рыб, птиц и млекопитающих, получаемых методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле / Л. И. Смирнов, Н. Н. Немова // Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. – 1977. – Вып. 84. – С. 85–92.
13. Лакин Р. Ф. Биометрия / Р. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
14. Ромоданова Э. А. Влияние малых доз гамма-облучения на множественные молекулярные формы каталазы и пероксидазы инбредных линий кукурузы / Э. А. Ромоданова, Е. Ю. Львова // Радиобиология. – 1993. – Т. 33, вып. 3. – С. 415–418.

**Королева Г. В., Залевська І. М. Порівняльний аналіз електрофоретичного складу білків печінки та м'язової тканини морського йоржа, що мешкає в бухтах з різноманітним антропогенним впливом // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2010. Вип. 3. С. 110–118.**

Білковий склад м'язової тканини та печінки морського йоржа (*Scorpaena porcus*), відловленого в бухтах Севастополя з різним рівнем забруднення, досліджували методом електрофореза в поліакриламидному гелі. Були відмічені різниці між електрофоретичними спектрами білків м'язів та печінки риб з бухт із різним рівнем антропогенного впливу. Ці відмінності виявились в зміні електрофоретичної рухомості, в розподілі білкових фракцій по електрофоретичним зонам і в їх гетерогенності. Якісні характеристики підтверджені статистичним аналізом. Вивчення особливостей електрофоретичних спектрів білків м'язової тканини можна використовувати для оцінки впливу антропогенних факторів на водні організми.

*Ключові слова:* морський йорж, електрофоретичні спектри, білки, м'язова тканина, печінка, антропогенні фактори, забруднення.

**Korolyova A. V., Zalevskaya I. N. The leaning particularities of the muscle and liver protein composition of scorpion-fishes from the bays with different level of antropogenical influence // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2010. Iss. 3. P. 110–118.**

The protein composition of the muscles tissue of scorpion-fish (*Scorpaena porcus*), which was taken from Sevastopol's bays with different level of pollution, was studied using the electrophoretic method in polyakryamid gel. The differences between electrophoretic muscle's and liver's protein spectres of the fishes from the bays with different antropogenic pressing were obtained. These differences were shown in changing of the electrophoretic mobility, in distribution of the protein fraction by electrophoretic zones and in their heterogenic. The qualitative characteristics are confirmed by statistical analyses. The learning particularities of the electrophoretic spectres muscle's protein may be used for estimation of the influence antropogenical factors to the water organisms.

*Key words:* scorpion-fishes, electrophoretic spectres, proteins, muscle tissue, liver, antropogenical factors, pollution.

*Поступила в редакцію 30.11.2010 г.*