

*На правах рукописи*



**Чеснокова Ирина Игоревна**

**БИОМАРКЕРЫ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ КАК ПОКАЗАТЕЛИ  
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ СРЕДЫ ИХ ОБИТАНИЯ**

*03.02.10 – гидробиология*

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Севастополь – 2017**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН»  
(г. Севастополь, РФ)

**Научный руководитель:**

**Руднева Ирина Ивановна**, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Немова Нина Николаевна**, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биологии Карельского научного центра РАН»

**Кузьмина Виктория Вадимовна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологии рыб Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института биологии внутренних вод РАН»

**Ведущая организация**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный университет»

Защита состоится «31» мая 2017 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 900.009.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского Российской академии наук» по адресу: 299011, г. Севастополь пр. Нахимова, 2, конференц-зал. e-mail: [dissovet@imbr-ras.ru](mailto:dissovet@imbr-ras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского Российской академии наук» по адресу: 299011, г. Севастополь пр. Нахимова, 2, и на сайте по адресу: <http://imbr-ras.ru/?p=5249>

Автореферат разослан ..... 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Поспелова Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время одна из ключевых проблем биологии, в том числе гидробиологии – поиск информативных и надежных биомаркеров оценки состояния организмов и среды их обитания в естественных и трансформированных человеком экосистемах. В гидробиологических исследованиях для определения состояния популяций животных используются разные методы оценки, в частности анализ ее размеров, воспроизводства, выживаемости, динамики численности, однако следует отметить, что эти методы позволяют распознать так называемые "негативные" тенденции только при исследовании значительного числа особей и в течение длительного времени. Поэтому в настоящее время все большее значение приобретают биохимические методы, позволяющие выявить нарушения на самых ранних этапах повреждения и создать систему «раннего оповещения неблагополучий» в экосистеме («early warning system») (Adams, 2005, Galloway, 2006, Van der Oost et al, 2003).

С этой целью широко используют биомаркеры, к которым относятся гематологические и клинико-патологические параметры органов и тканей. Однако в природных популяциях водных организмов они сильно варьируют, в связи с чем возникает необходимость стандартизации методов исследования, выявления адекватных биомаркеров и факторов, на них влияющих (Fazio et al. 2013, Naman et al., 2012). Информация по этим вопросам остается достаточно ограниченной. Для некоторых видов хозяйственно-полезных животных существуют хорошо известные значения гематологических и клинико-патологических показателей их статуса. Сравнительно меньше данных, характеризующих состояние животных (в том числе водных) диких популяций, в то время как такие исследования позволили бы оценить, как «здоровье» отдельных особей и их сообществ, так и идентифицировать органы-мишени, в наибольшей степени подверженные воздействию болезней (бактериальных, вирусных и пр.), токсинов (тяжелых металлов, нефтеуглеводородов, пестицидов) и других факторов, в том числе трофических (Fazio et al. 2013, Newman et al. 1997, Shulman, Love, 1999).

Известно, что биохимические показатели метаболизма зависят от среды обитания, видовой принадлежности рыб, возраста, стадии зрелости половых желез и состояния «здоровья». Принимая во внимание тот факт, что костистые рыбы прошли длительный эволюционный путь и характеризуются широким спектром адаптаций к различным экологическим условиям, можно полагать, что ни один вид не может быть универсальной моделью для всех остальных форм (Fazio et al., 2013). В связи с этим интерпретация значений биомаркеров является проблематичной, учитывая видовое разнообразие рыб. Для ряда костистых рыб были исследованы некоторые гематологические параметры, однако значения их сильно варьируют в разных работах ввиду отсутствия стандартных методов отбора и измерений. Тем не

менее, исследование данных показателей позволяет понять связь биохимических характеристик и механизмов адаптации видов к среде обитания, установить пределы толерантности и оценить устойчивость организмов в изменяющихся условиях (Fazio 2012 a-b, Naushad et al., 2013).

Другая проблема связана с разработкой методов оценки экологического состояния окружающей среды по реакциям обитающих в ней живых организмов. Она может рассматриваться в одном ключе при выявлении воздействий на биосистемы как отдельных факторов, так и их суммы, независимо от их генеза - физических, химических, биологических (Филенко, Михеева, 2007, Руднева и др., 2004, Руднева, 2006, Руднева и др., 2010, Hansson et al., 2006, Barsiene et al., 2006, Koreska et al., 2006). Для анализа морских объектов выбирают соответствующие биоиндикаторы – компоненты системы (виды или сообщества), наличие или статус, а также поведение которых служат показателями протекания естественных процессов, состояния среды или антропогенного воздействия на нее. К индикаторам прямого действия (биоиндикаторам) относятся некоторые показатели иммунитета, обмена липидов, изменения активности ферментов, гистопатологии, свидетельствующие о поражении отдельных органов (например, изменение активности аминотрансфераз, характеризующее поражение печени, сердца и пр.) (Adams, 2005).

В настоящее время в мировой литературе имеется немало работ, посвященных изучению метаболизма гидробионтов, изменяющегося под воздействием природных и антропогенных факторов. Результаты таких исследований получены, как правило, для какого-то одного вида, в то время как все еще недостаточно данных о биомаркерах состояния нескольких представителей сообщества того или иного класса животных, относящихся к различным экологическим группам.

Способность разных видов гидробионтов регулировать и поддерживать свой гомеостаз отличается, что также проявляется в интенсивности и направлениях ответных реакций на одно и то же негативное воздействие. Для понимания особенностей экологии разных видов рыб и механизмов их адаптаций к природным и антропогенным факторам крайне важно изучение параметров жизнедеятельности и метаболических реакций, играющих ключевую роль в поддержании "благополучия" как отдельно взятой особи, так и вида в целом. Такой подход к определению состояния гидробионтов позволяет комплексно оценить сложную картину взаимодействий между отдельными видами, воздействующими природными и антропогенными факторами, а полученные результаты могут иметь значение при разработке системы диагностики, мониторинга и охраны водоемов с учетом конкретных условий исследуемого региона.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы – исследовать некоторые биомаркеры физиолого-биохимического состояния четырех массовых видов черноморских рыб разных экологических групп и их зависимость от условий среды обитания.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Выявить видовые особенности значений биомаркеров у 4-х видов рыб, относящихся к разным экологическим группам: донной (морской ерш), придонной (султанка), придонно-пелагической (спикара) и пелагической (ставрида).
2. Выявить влияние пола и возраста на исследуемые биомаркеры у рыб, принадлежащих к данным экологическим группам.
3. Установить влияние сезонных изменений на биомаркеры рыб, относящихся к разным экологическим группам.
4. Сравнить ответные реакции на уровне биомаркеров у рыб из акваторий с различным уровнем комплексного хронического загрязнения.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые проведено комплексное исследование (с учетом видовых, половых, возрастных и сезонных особенностей) уровня эндогенной интоксикации, активности аминотрансфераз в тканях 4-х видов черноморских рыб, относящихся к разным экологическим группам. Установлены достоверные видовые отличия, отражающие разнообразие адаптаций видов к определенным условиям существования. Обнаружено, что уровень окисленной модификации белков в крови морского ерша и султанки в 2 раза ниже по сравнению с другими видами. Впервые показано, что активность антиоксидантных ферментов у донных видов рыб максимальна в крови и минимальна в печени, в то время как у придонных, придонно-пелагических и пелагических видов обнаружена обратная зависимость.

Показана неоднородность возрастных изменений всех исследуемых показателей у различных объектов. У большинства видов наблюдается снижение исследуемых параметров с возрастом, но в тканях некоторых рыб они остаются неизменными или возрастают.

Установлены разнонаправленные сезонные изменения значений биомаркеров у черноморских видов. Для донных и придонных рыб исследуемые показатели возрастают в летне-осенний период, у придонно-пелагических и пелагических видов выявлена обратная тенденция, за исключением активности аминотрансфераз в тканях морского ерша, которые повышаются в осенне-зимний период.

Исследуемые виды по-разному реагируют на негативное воздействие среды, реорганизуют свои обменные и защитные реакции. Содержание продуктов патологического белкового обмена в большинстве случаев не отличается у рыб из акваторий с разным уровнем загрязнения. В то же время активность ферментов,

участвующих в выполнении защитных функций, таких как антиоксидантные, и активность аминотрансфераз возрастают в тканях особей из акваторий, в большей степени подверженных антропогенному воздействию.

Загрязнения среды обитания неоднозначно влияет на рыб разных полов и возрастных групп. Наиболее уязвимыми являются особи младших возрастных групп.

Полученные результаты имеют теоретическое значение, так как вносят вклад в понимание фундаментальных механизмов адаптаций водных организмов к изменяющимся условиям среды, и могут быть использованы в решении ряда проблем гидробиологии, физиологии, биохимии, экологии и экотоксикологии рыб.

**Теоретическое и практическое значение полученных результатов.** Результаты работы представляют интерес для гидробиологии при разработке мониторинговых программ биотестирования и биоиндикации водных объектов с помощью биомаркеров состояния рыб. В настоящее время такой подход широко применяется в странах Европы, что позволяет привести в соответствие отечественные разработки с мировыми стандартами.

Критерии анализа состояния рыб, основанные на измерении уровня эндогенной интоксикации и окисления белков, активности ферментов антиоксидантной системы и аминотрансфераз, дают возможность получить адекватную информацию о состоянии популяций гидробионтов в современных условиях, прогнозировать и корректировать хозяйственную деятельность, разрабатывать мероприятия по их оздоровлению и сохранению видового разнообразия в акваториях подверженных активному воздействию человека.

Часть представленных данных была получена при поддержке гранта РФФИ «Поиск критериев оценки состояния морских прибрежных экосистем Севастопольского региона на основе биоиндикаторов рыб» (№ 14-44-01014), включены в программы подготовки аспирантов ФГБУН ИМБИ (курсы лекций «Гидробиология» и «Экотоксикология»), а также могут быть использованы при чтении курса лекций «Экология», «Гидробиология», «Экологическая биохимия» для студентов профильных высших учебных заведений.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Значения биомаркеров (содержание среднемолекулярных олигопептидов (СМО), уровень окислительной модификации белков (ОМБ), активность антиоксидантных ферментов (АОФ) и аминотрансфераз) в тканях рыб (морского ерша, султанки, спикары, ставриды) являются видоспецифичными, не зависят от пола и снижаются с возрастом.
2. У донных и придонных видов рыб (морской ерш и султанка) значения биомаркеров возрастают в летне-осенний период, у придонно-пелагических и пелагических видов (спикара и ставрида) – в зимне-весенний.

3. Из всех исследованных биомаркеров значения активности АОФ и аминотрансфераз являются наиболее информативными при оценке состояния рыб и могут быть использованы для анализа качества водной среды.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 03.02.10 – гидробиология, а именно п. 1. «Исследование влияния факторов водной среды на гидробионтов в природных и лабораторных условиях с целью установления пределов толерантности и оценки устойчивости водных организмов в условиях изменяющихся физико-химических свойств природных вод (в частности, при антропогенном воздействии)», и п. 7. «Разработка методов экологического мониторинга водных экосистем».

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Автором была разработана методология исследования, проведены эксперименты, выполнены анализ, обобщение и статистическая обработка полученных данных. Полученные результаты были сопоставлены с данными литературных источников.

**Апробация результатов диссертации.** Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: III International Young Scientists Conference «Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution» (Odessa, 2007), Международной научной конференции «Современные проблемы морской инженерной экологии» (Ростов-на-Дону, 2008), международной научной конференции «Современные проблемы гидробиологии. Перспективы, пути и методы решений» (Херсон, 2008), II Міжнародної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2009), IV Международной научной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы», (Харьков, 2009 г), Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2007, 2010, 2011), на V Международной научно-практической конференции «Человек и животные» (Астрахань, 2010), международной научной конференции «Водные биоресурсы и аквакультура: современное состояние и перспективы научного обеспечения», (Киев, 2010), Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих учених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запорожье, 2011), III Международной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» (Борок, 2011), VIII международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии – 2012» (Гродно, 2012), III международной научно-практической конференции «Современные проблемы биологии, экологии и химии» (Запорожье, 2012), V Международной ихтиологической научно-практической конференции «Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии» (Черновцы, 2012), на международной научно-практической конференции

«Трансмиссивные болезни животных: актуальные аспекты биобезопасности и контроля» (Алушта, 2012), Всероссийской конференции с международным участием «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптации гидробионтов» (Борок, 2012), VII Международной научной конференции «Биоразнообразие и роль животных в экосистемах» (Днепропетровск, 2013), V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова (Борок, 2014), XIII Международной научно-практической экологической конференции «Биоразнообразие и устойчивость живых систем» (Белгород, 2014), Международной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России (Ростов-на-Дону, 2014), XI Всероссийской научной конференции «Актуальные проблемы экологии и сохранения биоразнообразия России и сопредельных стран» (Владикавказ, 2015), VI Международной конференции «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов» (Борок, 2015).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 179 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 302 источника, из них 198 иностранных. Текст иллюстрирован 22 таблицами, 46 рисунками.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 40 работ, из них 9 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и Украины (вышедшие из печати до 2014 г.).

**Благодарности.** Автор выражает особую благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Рудневой И.И. за помощь и консультации при постановке цели и задач исследований, обсуждении полученных результатов, экспертам д.б.н., профессору, чл.-корр. НАНУ Шульману Г.Е., к.б.н. Царину С.А., д.б.н., проф. Солдатову А.А., д.б.н., проф. Самышеву Э.З. за критическую оценку работы и ценные замечания, к.б.н., с. н.с. Кузьминовой Н.С. за ценные советы и рекомендации по решению поставленных задач, к.б.н., зав. кафедры биохимии КФУ Залевской И.Н. и н.с. Карадагского заповедника Подунай Ю.А. за консультации по методическим аспектам определения биохимических параметров, д.б.н. Овен Л.С., к.б.н. Салеховой Л.П., д.б.н., проф., Зуеву Г.В., к.б.н. Скуратовской Е.Н., вед. инж. Ковыршиной Т.Б., вед. инж. Самотой Ю.В. за консультации и помощь в проведении биологического анализа рыб, а также Шайде В.Г. за помощь в техническом обеспечении научных исследований, всем работникам малого флота ИМБИ и вед. инж. Завьялову А.В. за доставку ихтиологического материала.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### РАЗДЕЛ 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Проанализированы имеющиеся в мировой литературе данные о процессах развития состояния эндогенной интоксикации и образования его продуктов (эндотоксинов, наиболее ярким примером которых являются среднемолекулярные олигопептиды), свободнорадикального окисления (СРО) в живых организмах, дана общая характеристика антиоксидантной системы (АОС) рыб. Приведены сведения о половых и возрастных особенностях содержания у гидробионтов продуктов СРО и АОС, а также о влиянии на них природных и антропогенных факторов. Показана роль параметров АОС как биомаркеров, характеризующих состояние рыб в условиях интенсивного загрязнения водной среды.

### РАЗДЕЛ 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве районов исследований были выбраны 5 акваторий г. Севастополя: бухты Стрелецкая, Карантинная, Александровская, Мартынова и Казачья (рисунок 1). Наиболее загрязненной является б. Стрелецкая, а условно чистой - б. Казачья, другие акватории занимают промежуточное положение и отличаются типами загрязнения (Осадчая и др., 2004, Куфтаркова и др., 2008; Омельченко, 2009).



Рисунок 1. Районы исследования – бухты г. Севастополя

Исследования проводили на 4 массовых видах черноморских рыб, относящихся к разным экологическим группам: морской ерш ( $n = 333$ ) (*Scorpaena porcus* L.) (донная группа), султанка ( $n = 76$ ) (*Mullus barbatus ponticus* Essipov) (придонная группа), спикара ( $n = 123$ ) (*Spicara flexuosa* Rafinesque) (придонно-пелагическая группа), ставрида ( $n = 98$ ) (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev) (пелагическая группа). Полный биологический анализ рыб проводили по общепринятым методикам (Правдин, 1966).

Уровень эндогенной интоксикации (ЭИ) определяли по содержанию среднемолекулярных олигопептидов (СМО) по реакции с реактивом Бенедикта

(Чиркин, 2002). Уровень окислительной модификации белков (ОМБ) анализировали на основе реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белка с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов (Дубинина и др., 1995). Активность антиоксидантных ферментов (АОФ) в эритроцитах крови рыб определяли спектрометрическими и титрометрическими методами. Активность каталазы (КАТ) выявляли по реакции разложения перекиси водорода (Асатиани, 1969), активность пероксидазы (ПЕР) – по реакции с бензидином (Литвин, 1981). Активность ферментов пересчитывали на мг белка в минуту. Содержание белка определяли согласно методу, описанному (Lowry et al., 1951). Активность аминотрансфераз анализировали по методу Райтмана-Френкеля с использованием стандартных наборов «Філісіт» (Украина) - «АсАТ» и «АлАТ». Коэффициент де Ритиса рассчитывали, как отношение активности аспартатаминотрансферазы (АсАт) к активности аланинаминотрансферазы (АлАт).

Исследования биохимических параметров проводили на образцах, полученных от индивидуальных особей. Статистическую обработку данных проводили по (Лакин, 1990). Вычисляли среднее арифметическое (М), ошибку среднего арифметического (m). Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми рядами считали достоверными и статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . С целью выявления зависимости между исследуемыми параметрами рассчитывали коэффициент корреляции (r).

### РАЗДЕЛ 3 ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ И УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

**Видовые особенности содержания средномолекулярных олигопептидов и уровень окислительной модификации белков в тканях черноморских рыб.** Показано, что содержание СМО и уровень ОМБ в тканях черноморских рыб минимальны у представителя донной группы (рисунки 2 и 3).

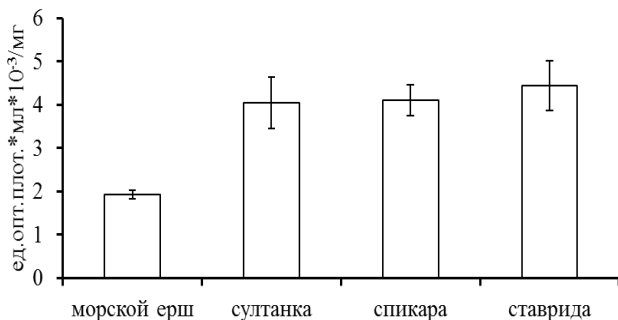


Рисунок 2. Содержание средномолекулярных олигопептидов в крови черноморских рыб, (М±m)

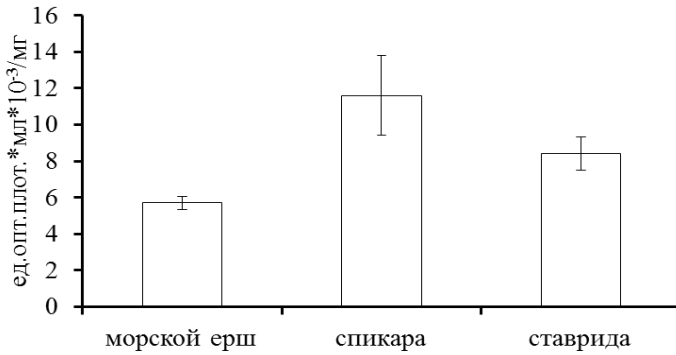


Рисунок 3. Содержание среднемoleкулярных олигопептидов в печени черноморских видов рыб, ( $M \pm m$ )

Виды, принадлежащие к другим экологическим группам, имеют близкие значения уровня ЭИ и ОМБ, за исключением султанки, уровень ОМБ которой близок к показателям морского ерша.

**Половые особенности содержания среднемoleкулярных олигопептидов в тканях черноморских рыб.** Содержание СМО в печени некоторых исследуемых видов не имеет достоверных отличий, однако у самок этот показатель выше, аналогичная картина и для крови рыб. Исключением является султанка, уровень ЭИ в крови которой достоверно выше у самцов ( $p < 0,05$ ).

**Возрастные особенности содержания среднемoleкулярных олигопептидов в тканях черноморских рыб.** Уровень ЭИ в тканях черноморских рыб снижается с возрастом или остается неизменным, за исключением показателя в печени морского ерша, где наблюдается небольшое повышение содержания СМО у рыб старших возрастных групп.

**Сезонные особенности содержания среднемoleкулярных олигопептидов в крови черноморских рыб.** Для морского ерша, султанки и спикары показано возрастание уровня ЭИ в теплые сезоны, в то время как у пелагической ставриды в летне-осенний период отмечено минимальное содержание СМО. Установлена существенная прямая связь данного показателя с температурой ( $r = 0,49-0,94$ ) и обратная ( $r = - 0,52$ ).

**Содержание среднемoleкулярных олигопептидов и уровень окислительной модификации белков в крови черноморских рыб, обитающих в бухтах с различной антропогенной нагрузкой.**

Показано сходство в уровне ЭИ в крови морского ерша, спикары и ставриды из исследуемых бухт (рисунок 4).

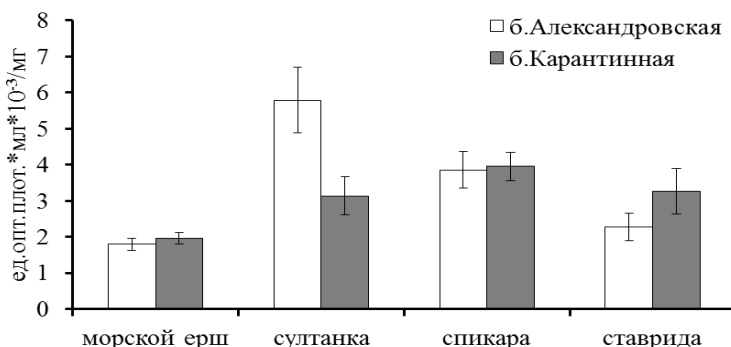


Рисунок 4. Уровень эндогенной интоксикации в крови черноморских рыб, обитающих в бухтах с различной антропогенной нагрузкой, ( $M \pm m$ )

Достоверные различия значений ЭИ были получены в крови султанки - в б. Александровская значения ЭИ более чем 1,5 раза выше, чем у особей из б. Карантинная. Уровень ЭИ в печени морского ерша из б. Карантинная достоверно выше, чем в б. Александровская ( $p < 0,05$ ). Существенных отличий в содержании СМО в крови особей морского ерша одного возраста, обитающих в бухтах с различной антропогенной нагрузкой, не выявлено. Достоверных отличий уровня ОМБ в сыворотке морского ерша из двух бухт также не обнаружено. Уровень ОМБ в крови ставриды, выловленной в Карантинной бухте, достоверно выше по сравнению с показателями рыб из б. Мартыновой бухты ( $p < 0,05$ ).

#### **РАЗДЕЛ 4 АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ**

**Видовые особенности активности антиоксидантных ферментов в тканях черноморских рыб.** Для донных рыб показаны максимальные значения активности КАТ и ПЕР в крови и минимальные в печени. У придонных, придонно-пелагических и пелагических видов в крови наблюдается меньшая активность АОФ по сравнению с морским ершом, а в печени – более высокая за исключением ПЕР у ставриды. Следует отметить высокую корреляцию между активностью ПЕР и КАТ в крови исследуемых рыб ( $r = 0,94$ ).

**Половые особенности активности антиоксидантных ферментов в тканях черноморских рыб.** Активность АОФ мало зависит от половой принадлежности рыб, за исключением султанки и ставриды.

**Возрастные особенности активности антиоксидантных ферментов в тканях черноморских рыб.** Выявлено снижение активности КАТ и ПЕР в крови морского ерша старших возрастных групп, а у ставриды отмечено ее повышение у 3-летних особей. Установлена значительная корреляция между возрастом и активностью как КАТ ( $r = -0,76$ ), так и ПЕР ( $r = -0,77$ ) в крови морского ерша. Обнаружена высокая корреляция между активностью обоих ферментов в крови разных возрастных групп ( $r = 0,88$ ). Активность АОФ в печени исследуемых рыб достоверно снижается на протяжении всей жизни или же незначительно варьирует ( $p < 0,05$ ).

**Сезонные особенности активности антиоксидантных ферментов в тканях черноморских рыб.** В крови и печени исследованных видов рыб максимальная активность АОФ приходится на теплый период года (весна, лето, осень), в то время как зимой активность КАТ и ПЕР значительно ниже. Активность КАТ в тканях морского ерша максимальна летом и зависит от температуры ( $r = 0,95-0,99$ ). Активность ПЕР максимальна осенью и корреляция ниже, чем для КАТ ( $r = 0,53-0,61$ ). У рыб других экологических групп связь между активностью ферментов и

температурой воды выражена в меньшей степени, за исключением ПЕР в крови султанки ( $r = 0,79$ ).

**Активность антиоксидантных ферментов в тканях черноморских рыб, обитающих в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки.** Активность КАТ в крови морского ерша была максимальной в бухтах Александровская и Стрелецкая, ПЕР – в б. Александровская. Активность КАТ была ниже у рыб из б. Карантинная почти в 3 раза, а у рыб из б. Казачья - в 2 раза, по сравнению с особями из б. Александровская и Стрелецкая. Минимальное значение ПЕР также установлено у рыб из б. Карантинная. Достоверных отличий активности ПЕР в крови ерша из трех исследуемых бухт (Стрелецкой, Казачьей и Карантинной) не выявлено. В то время как активность ПЕР у рыб из б. Александровская достоверно выше, по сравнению с активностью фермента у особей из других акваторий ( $p < 0,05$ ). Для султанки и спикары активность КАТ в печени выше у особей из б. Александровская (рисунок 5). Для спикары установлены наибольшие различия: активность фермента в печени рыб из б. Александровская в 4 раза выше нежели у особей из б. Карантинная. У султанки различия между показателями из двух бухт не столь ярко выражены, однако достоверны. В печени морского ерша, и особенно ставриды выявлена достоверно более высокая активность КАТ у рыб из б. Карантинная ( $p < 0,05$ ).

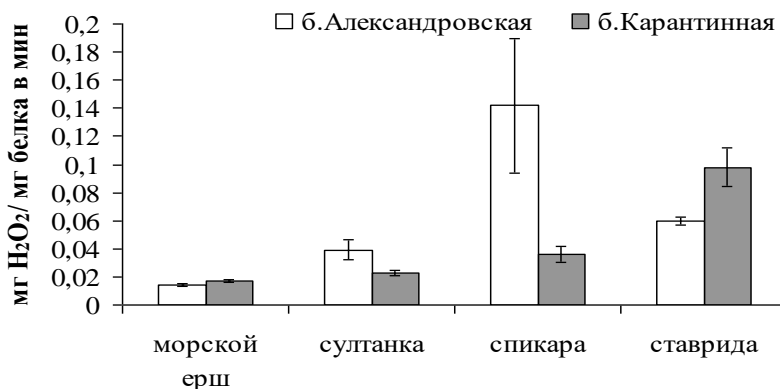


Рисунок 5. Активность каталазы в печени рыб из двух акваторий с различным уровнем антропогенной нагрузки, ( $M \pm m$ )

Для всех исследованных видов установлена более высокая активность ПЕР в печени рыб из б. Александровская. Достоверные отличия получены для морского ерша и спикары (рисунок 6) ( $p < 0,05$ ).

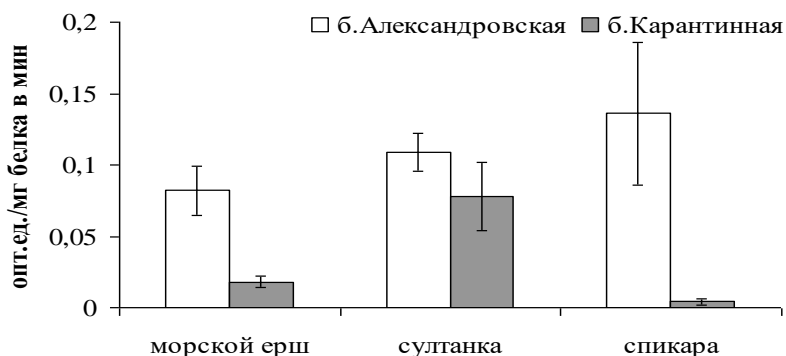


Рисунок 6. Активность пероксидазы в печени черноморских рыб, из разных акваторий ( $M \pm m$ )

Кровь самок морского ерша оказалась чувствительной к антропогенному воздействию: активность АОФ в 2-3 выше у особей из б. Александровской. У самцов большим изменениям подверглись показатели печени: у морского ерша и ставриды установлены высокие значения активности КАТ в б. Карантинная, в то время как у султанки и спикары – в б. Александровская. Активность ПЕР у самцов всех изученных видов была выше в б. Александровская.

В период полового созревания и в начале репродуктивного периода жизни морского ерша (в возрасте 3 - 5 лет) выявлена достоверно большая активность КАТ в печени из б. Карантинная ( $p < 0,05$ ) (рисунок 7).

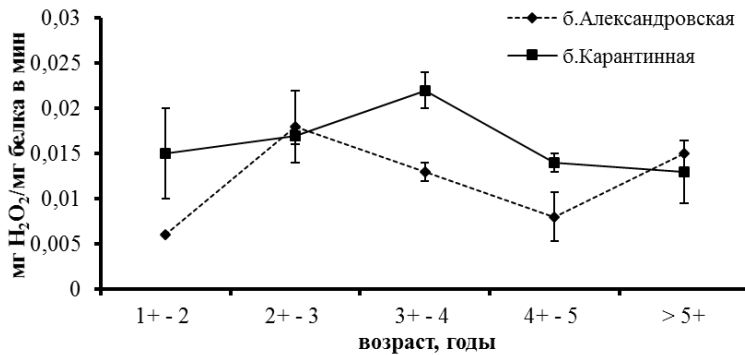


Рисунок 7. Активность каталазы в печени морского ерша разных возрастов из двух акваторий с различным уровнем антропогенной нагрузки, ( $M \pm m$ )

Установлены существенные отличия у молодых особей морского ерша, у рыб старших возрастных групп из двух районов значения активности ПЕР в печени сближаются (рисунок 8).

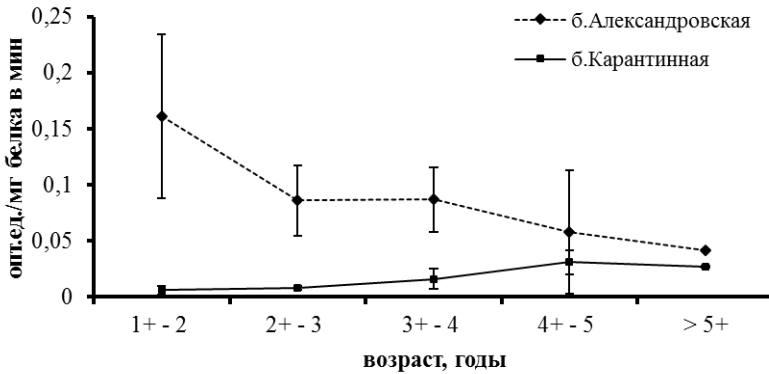


Рисунок 8. Активность пероксидазы в печени морского ерша разных возрастных групп из двух акваторий с различным уровнем антропогенной нагрузки, ( $M \pm m$ )

## РАЗДЕЛ 5 ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В ТКАНЯХ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

**Видовые особенности активности аминотрансфераз в тканях черноморских рыб.** Установлено, что активность АлАт в крови мало зависит от принадлежности к экологической группе исследуемого вида, в то время как АсАт несколько возрастает в ряду донные – придонные – придонно-пелагические – пелагические (рисунок 9). В печени активность аминотрансфераз также увеличивается от донных к придонно-пелагическим, однако у ставриды активность ферментов низкая и имеет близкие значения с показателями донного ерша (рисунок

10). Коэффициент де Ритиса в крови исследованных рыб был одинаков, за исключением спикары.

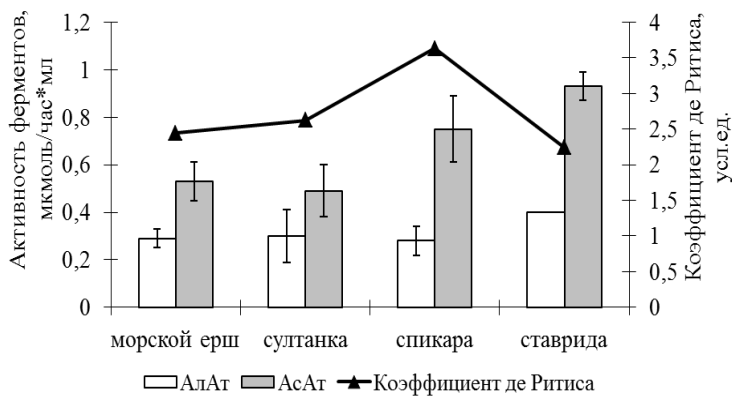


Рисунок 9. Активность аминотрансфераз в сыворотке крови рыб, (M±m)

В печени различия более выражены: минимальные значения получены для султанки и максимальные для ставриды

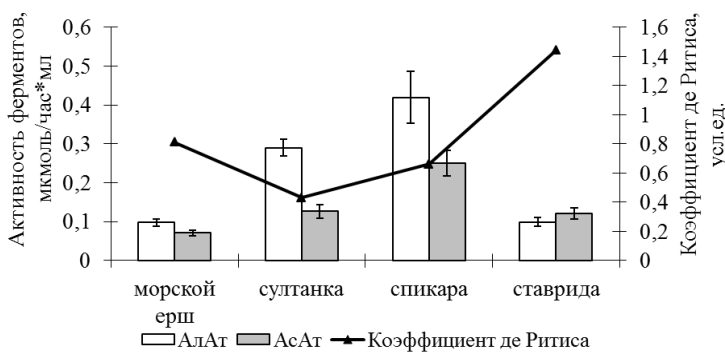


Рисунок 10. Активность аминотрансфераз в печени черноморских видов рыб, (M±m)

**Половые особенности активности аминотрансфераз в тканях черноморских рыб.** Для большинства изученных видов не выявлено достоверных половых отличий активности аминотрансфераз в печени (исключением является султанка, у которой активность фермента выше у самцов). В сыворотке крови морского ерша установлено достоверно более высокое значение активности аминотрансфераз у самок ( $p < 0,05$ ). **Возрастные особенности активности аминотрансфераз в тканях черноморских рыб.** Активность аминотрансфераз в сыворотке крови скорпены разного возраста меняется неоднозначно. В печени спикары и султанки установлено достоверное снижение активности ферментов ( $p < 0,05$ ).

**Сезонные особенности активности аминотрансфераз в тканях черноморских рыб.** Для всех исследованных видов рыб установлена связь активности аминотрансфераз в печени и температуры воды (прямая значительная (морской ерш  $r = 0,62$ ) и отрицательная умеренная (спикара  $r = - 0,44$ )). Обнаружена сильная коррелятивная связь между активностью обеих аминотрансфераз в разные сезоны года у спикары ( $r = 0,96$ ) и значительная для морского ерша ( $r = 0,63$ ). Связь коэффициента де Ритиса с температурой воды обратная – значительная для морского ерша ( $r = - 0,69$ ) и слабая для спикары ( $r = - 0,26$ ). В сыворотке крови

морского ерша минимальная активность наблюдается в весенне-летний период и максимум – осенью и зимой.

**Активность аминотрансфераз в тканях черноморских рыб, обитающих в бухтах с различной антропогенной нагрузкой.** Различий в активности АлАт в крови исследованных рыб из трех бухт не установлено. Не обнаружено достоверных отличий активности АсАт у рыб из б. Карантинная и Александровская, однако отмечено в 10 раз более низкое значение активности фермента у рыб в б. Стрелецкая. Активность аминотрансфераз в печени донных рыб выше в б. Карантинная, у придонных, придонно-пелагических и пелагических – в б. Александровская. В печени самцов наибольшим изменениям подвергается активность АлАт, а в печени самок – АсАт. Коэффициент де Ритиса имел наибольшие отличия у разнополых особей морского ерша из двух бухт.

В печени спикары и султанки из б. Александровская отмечено снижение активности обоих ферментов и АсАТ в печени спикары из б. Карантинная с возрастом. У ставриды установлено возрастание активности АлАт у особей старших возрастных групп из б. Карантинная. Коэффициент де Ритиса в печени черноморских рыб из б. Карантинная и Александровская меняются неоднозначно (рисунок 11).

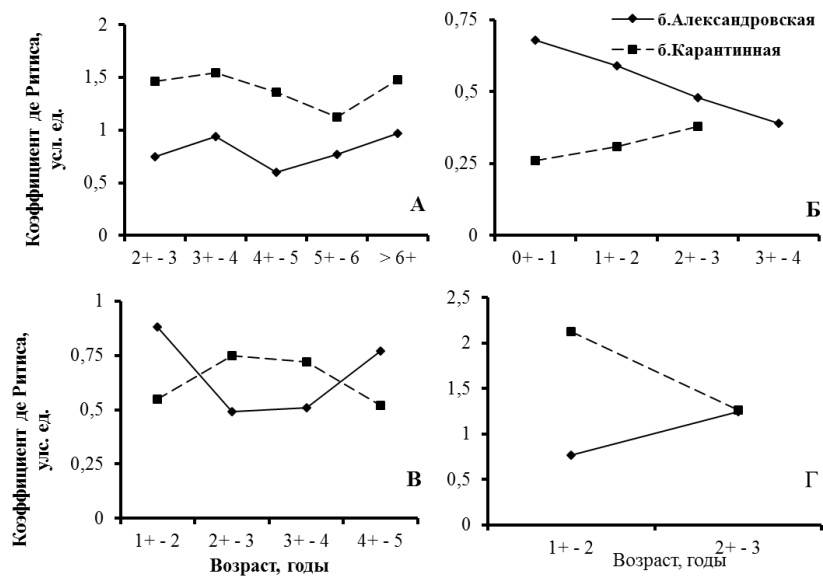


Рисунок 11. Коэффициент де Ритиса в печени черноморских рыб разных возрастных групп, обитающих в бухтах с различным уровнем антропогенной нагрузки (А – морской ерш, Б – султанка, В – спикара, Г - ставрида).



## РАЗДЕЛ 6 ОБСУЖДЕНИЕ

На основании проведенных исследований было установлено, что тестируемые биомаркеры черноморских рыб имеют выраженную видоспецифичность и зависят от комплекса факторов – половой принадлежности, возраста, сезона года, а также загрязнения среды обитания.

Видовые отличия значений, исследуемых биомаркеров могут быть обусловлены особенностями белкового, углеводного и липидного обмена рыб. Активность АОФ повышена в крови у морского ерша по отношению к остальным видам, тогда как для других показателей установлена противоположная направленность, за исключением активности ПЕР и АсАТ в печени ставриды. Рыбы донной группы непосредственно соприкасаются с глубинными слоями воды и грунтов, в которых оседают различные загрязнители, в том числе токсичные. Виды, обитающие в поверхностных водах, находятся в более комфортных условиях и, как правило, обладают большей подвижностью и повышенным уровнем метаболизма, что в свою очередь влияет на активность АОФ (Filho et al., 1993; Sole et al., 2009).

Установлена неоднозначность влияния пола на значения исследуемых биомаркеров рыб. Проведенные ранее исследования уровня ОМБ, активности АОФ и аминотрансфераз в тканях рыб также показали в большинстве случаев отсутствие половых отличий (Руднева, Скуратовская, 2009; Рощина, 2010; Svoboda et al., 2001; Yuosefian et al., 2010, 2011).

Старение живых организмов сопровождается разнонаправленными изменениями активности ферментов, в том числе АОФ и аминотрансфераз, что позволяет поддерживать на соответствующем функциональном уровне многие жизненно важные процессы, но при этом продукты окисления и распада белков накапливаются (Salo et al., 2009, Arteni et al., 2011.). Для большинства изученных нами видов характерна максимальная активность АОФ и аминотрансфераз в младшей возрастной группе и последующее их снижение с возрастом. Аналогичные результаты получены и для других рыб (Вахтина, 2005, Chin-Yuan Hsu et al., 2008). Снижение активности аминотрансфераз связано с торможением белкового роста, снижением утилизации, потребления и эффективности использования азота, уменьшением содержания коферментов, что согласуется с литературными данными (Шульман, Урденко, 1989; Бичарева, 2010; Рощина, 2010).

Биомаркеры состояния пойкилотермных животных тесно связаны с сезонными изменениями окружающей среды (колебания температуры воды, содержание кислорода, соленость, обеспеченность пищей, степень загрязнения акваторий) (Tong Qui et al., 2007; Ebrahimnezhadarabi et al., 2011). Для большинства исследованных видов установлено возрастание значений исследуемых показателей в тканях в теплое время года и снижение зимой. Исключением является морской ерш, в тканях которого, максимальная активность ПЕР и аминотрансфераз которого

приходится на осень. В ряде случаев установлено снижение значений биомаркеров в летней период, что, по-видимому, связано с модифицирующим влиянием антропогенного воздействия, что необходимо учитывать при проведении биомониторинговых исследований (Adham, 2002; Padmini et al., 2008; Ajani et al., 2011).

Для большинства тестируемых показателей показано изменение их значений у рыб, обитающих в неблагоприятных условиях: у донных и придонных – в б. Александровская и Стрелецкая, у пелагических – в б. Карантинная. Наиболее информативными являются данные об активности АОФ в крови морского ерша из 4-х разных акваторий. Повышенная активность АОФ у рыб из б. Александровская и б. Стрелецкая связана с более сильным загрязнением грунтов. Грунты б. Карантинной и Казачьей являются более чистым, поэтому активность АОФ, особенно КАТ, здесь значительно ниже.

Полученные отличия показателей рыб разного возраста, обитающих в исследуемых районах, могут быть обусловлены большей восприимчивостью и меньшей адаптированностью к различного рода токсикантам молодых особей (Чесалина, Руднева, 1998; Руднева и др., 2000, Чесалина и др., 2000).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе в качестве биомаркеров, отражающих состояние акваторий г. Севастополя, были предложены физиологи-биохимические показатели четырех массовых прибрежных видов рыб Черного моря (морского ерша, султанки, спикары и ставриды), принадлежащих к разным экологическим группам, а именно - содержание СМО, уровень ОМБ, активность АОФ, активность аминотрансфераз в крови и печени.

Обнаружены видовые отличия исследуемых параметров, что может быть связано с эволюционно выработанной приспособленностью видов к условиям обитания. Не установлено четкой зависимости значений биомаркеров от половой принадлежности. Тогда как возраст оказывает более существенное влияние на состояние организмов рыб, активность АОФ и аминотрансфераз падает с возрастом, что, по-видимому, вызвано с одной стороны с накоплением токсичных веществ, а с другой - с замедлением всех обменных процессов. Несмотря на общую тенденцию повышения значений всех показателей в теплое время года, в ряде случаев отмечено снижение активности ферментов и содержания СМО в тканях в весенне-летний период, что может свидетельствовать о модифицирующем воздействии антропогенной деятельности на акватории. Значения содержания СМО и уровень ОМБ у большинства исследованных видов близки у особей, отловленных в тестируемых акваториях, в то время как активность тестируемых ферментов

возрастает у рыб из более загрязненных районов, что свидетельствует о большей чувствительности ферментов к негативным изменениям в среде.

Таким образом, при проведении мониторинговых исследований для каждого вида необходимо учитывать особенности биологии, возрастные, половые, сезонные изменения биохимических параметров в разных тканях. Дальнейший поиск наиболее информативных биомаркеров состояния, позволяющих определить границы толерантности и оценить устойчивость гидробионтов в современных условиях нарастающего антропогенного воздействия, а также отражающий качество среды их обитания, является одним из приоритетных направлений в гидробиологии.

## ВЫВОДЫ

1. Исследуемые биомаркеры (содержание среднемолекулярных олигопептидов и окисленномодифицированных белков, активность антиоксидантных ферментов и аминотрансфераз) в тканях 4 видов черноморских рыб характеризуют их адаптации к сочетанному действию комплексного загрязнения и природных факторов и могут быть использованы в мониторинговых программах для оценки состояния рыб и среды их обитания.

2. Содержание СМО и ОМБ в тканях морского ерша в 2 раза ниже по сравнению с другими видами рыб. Виды, принадлежащие к придонной, придонно-пелагической и пелагическим группам, имеют близкие значения содержания исследуемых биомаркеров, за исключением султанки, уровень ОМБ которой сходен с соответствующими значениям у морского ерша.

3. Активность антиоксидантных ферментов у донных рыб максимальна в крови и минимальна в печени, а у придонных, придонно-пелагических и пелагических видов обнаружена обратная зависимость (за исключением активности ПЕР в печени ставриды). Установлена высокая корреляция между активностью КАТ и ПЕР в крови ( $r = 0,94$ ).

4. Для большинства видов рыб не обнаружено половых различий по содержанию исследуемых биомаркеров, за исключением содержания СМО и активности ПЕР в крови, активности КАТ и аминотрансфераз в печени султанки, а также уровня СМО в крови спикары, активности КАТ в печени ставриды, активности аминотрансфераз в крови морского ерша.

5. Значения исследуемых биомаркеров снижаются в 2-3 раза в тканях рыб старших возрастных групп по сравнению с показателями у молодых особей, за исключением содержания СМО в печени морского ерша и ставриды, и в крови султанки, а также активности АОФ в крови ставриды. Установлена прямая ( $r = 0,49 - 0,94$ ) и обратная ( $r = -0,28 - -0,98$ ) корреляционная связь между биомаркерами и возрастом рыб.

6. Для донных и придонных видов рыб исследуемые биохимические показатели возрастают в летне-осенний период в 2-7 раз по сравнению с зимне-весенним. У придонно-пелагических и пелагических видов выявлена обратная тенденция, за исключением активности аминотрансфераз в крови и аспартатаминотрансферазы в печени морского ерша, которые повышаются в 2-3 раза в осенне-зимний период по сравнению с весенне-летним.

7. Содержание СМО и ОМБ в тканях рыб из тестируемых акваторий, отличающихся уровнем загрязнения, не имеет достоверных отличий у большинства исследованных видов, за исключением СМО в крови султанки, содержание которого достоверно выше у рыб из б. Александровская ( $p < 0,05$ ). Содержание СМО в печени морского ерша и ОМБ в сыворотке крови ставриды достоверно выше у особей из б. Карантинная ( $p < 0,05$ ).

8. Активность антиоксидантных ферментов и аминотрансфераз в 1,5-3 раза выше в тканях рыб из б. Александровская по сравнению с особями из б. Карантинная, за исключением активности КАТ печени ставриды и активности аланинаминотрансферазы в печени морского ерша. Установлено влияние пола и возраста на биохимические показатели состояния рыб, отловленных в бухтах с различным уровнем загрязнения, при этом наиболее чувствительными к неблагоприятным условиям обитания являются молодые особи.

## **СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ЧЕСНОКОВОЙ (ДОРОХОВОЙ), ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:**

1. **Дорохова И.И.** Экологические особенности содержания модифицированных форм сывороточных белков у массовых видов рыб Черного моря / И.И. Дорохова // Рыбное хозяйство Украины. – 2007. – Вып. 3-4 (50, 51). – С. 27–29.
2. Скуратовская Е.Н. Влияние экологических и антропогенных факторов на процессы окислительной модификации сывороточных белков черноморских рыб / Е.Н. Скуратовская, **И.И. Дорохова**, Ю.А. Граб // Рыбное хозяйство Украины. – 2007. – № 5. – С. 12–15.
3. **Дорохова И.И.** Видовые особенности активности аминотрансфераз в тканях черноморских рыб / И.И. Дорохова // Ветеринарна медицина : межвід. темат. наук. зб. - 2012. – Вип. 96. – С. 286–287.
4. **Дорохова И.И.** Содержание тяжелых металлов и биоиндикаторы состояния печени некоторых видов черноморских рыб / И.И. Дорохова, Н.С. Кузьминова, И.И. Руднева, Д.А. Болдырев // Ветеринарна медицина : межвід. темат. наук. зб. - 2012. – Вип. 96. – С. 288–290.

5. **Дорохова И.И.** Сезонные колебания уровня эндогенной интоксикации в крови морского ерша / И.И. Дорохова // Вестник Запорожского национального университета. Биологические науки. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
6. **Дорохова И.И.** Сезонные изменения активности аминотрансфераз в печени некоторых черноморских рыб / И.И. Дорохова // Биологічні системи. – 2012. – Т. 4, № 4. – С. 371–375.
7. Скуратовская Е.Н. Сезонные вариации некоторых биомаркеров крови морского ерша *Scorpaena porcus* L. из прибрежных акваторий г. Севастополя / Е.Н. Скуратовская, **И.И. Дорохова** // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2013. – № 2 (55). – С. 20–24.
8. Руднева И.И. Возрастная динамика некоторых морфофизиологических и биохимических параметров черноморской ставриды *Trachurus mediterraneus* / И.И. Руднева, Н.С. Кузьминова, **И.И. Дорохова** // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Серия 3: Биология. – 2014. – Вып. 1. – С. 39–47.

**Научные статьи в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:**

9. Rudneva I.I. Bioindication of the environmental state of marine areas with the use of fish biomarkers / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, **I.I. Dorokhova**, Yu.A. Grab, I.N. Zalevskaya, S.O. Omel'chenko // Water Resources. – 2011. – Vol. 38, № 1. – P. 107–112. (WoS IF 0,310 Scopus Q3 Rank 0,280).
10. Kuzminova N. Age- Dependent Changes of Mediterranean *Trachurus mediterraneus* Male and Female from Coastal Waters of Sevastopol (Black Sea, Ukraine) / N. Kuzminova, **I. Dorokhova**, I. Rudneva // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2014. – Vol. 14. – P. 183–192. (WoS IF: 0.591, SCOPUS Q3, Rank 0,302).

**Статьи в других изданиях:**

11. **Дорохова И.И.** Видовые особенности уровня эндогенной интоксикации в крови черноморских рыб / И.И. Дорохова // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т. 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов : сборник научных статей. – Петрозаводск, 2010. – С. 40–43.
12. **Дорохова И.И.** Особенности морфофизиологических и биохимических параметров печени морского ерша из бухт с различным уровнем загрязнения / И.И. Дорохова, Ю.В. Новоселова // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Т. 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов : сборник научных статей. – Петрозаводск, 2010. – С. 44–47.
13. **Дорохова И.И.** Сезонные колебания некоторых биохимических показателей в тканях морского ерша / И.И. Дорохова // Актуальные проблемы экологии :

материалы VIII междунар. науч.-практ. конф. (Гродно, 24–26 окт. 2012 г.). – Гродно, 2012. – Ч. 1. – С. 148–149.

14. Rudneva I.I. Use of fish blood biomarkers in evaluation of marine environment health / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, **I.I. Dorohova**, T.B. Kovyrshina // World Journal of Science and Technology. – 2012. – Vol. 2, no. 7. – P. 19–25.

15. Rudneva I.I. Comparative Studies of Hepatic and Blood Biomarkers in Three Species of Black Sea Elasmobranchs / I.I. Rudneva, **I.I. Dorokhova**, E.N. Skuratovskaya, N.S. Kuz'minova // International Journal of Marine Science. – 2014. – Vol. 4, no. 44. – P. 1–14.

#### **Монографии:**

16. Руднева И.И. Экотоксикологическая оценка состояния популяций массовых прибрежных видов черноморских рыб / И.И. Руднева, Н.С. Кузьминова, Е.Н. Скуратовская, О.В. Рощина, **И.И. Дорохова**, С.О. Омельченко, С.К. Костова // Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей / ред. В.Н. Еремеев, А.В., Гаевская, Г.Е. Шульман, Ю.А. Загородняя ; НАН Украины, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского. - Севастополь, 2011. – С. 329–352.

17. Экотоксикологические исследования прибрежной черноморской ихтиофауны в районе Севастополя / А.В. Завьялов, И.Н. Залевская, Т.Б. Ковыршина, Н.С. Кузьминова, Л.С. Овен, С.О. Омельченко, Ю.В. Подунай, И.И. Руднева, Л.П. Салехова, Ю.В. Самотой, Е.Н. Скуратовская, **И.И. Чеснокова**, В.Г. Шайда, Н.Ф. Шевченко ; отв. ред. И.И. Руднева. - Москва : «ГЕОС», 2016. - 360 с.

18. Rudneva I.I. Fish Biodiversity: The Role of Defense Systems to the Adaptation to Ecological Conditions in the Black Sea Ecosystem / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, **I.I. Chesnokova**, T.B. Kovyrshina, S.O. Omelchenko, I.N. Zalevskaya // Baltic and Black Sea: Ecological Perspectives, Biodiversity and Management / Ed. A. Mills. – Nova Science Publishers, 2016. – Ch. 4. – P. 111–146.

19. Rudneva I.I. Biomarker response of Black Sea Scorpion Fish *Scorpaena porcus* to Anthropogenic Impact / I.I. Rudneva, E.N. Skuratovskaya, **I.I. Chesnokova**, **V.G. Shaida**, T.B. Kovyrshina // Advances in Marine Biology / Eds: A. Kovács, P. Nagy. - Nova Science Publishers, 2016. - Vol. 1, ch. 5. – P. 119–147.