



УДК УДК 574.52:574.38:577.127

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА У МОЛОДИ КОЛЮШКИ ТРЕХИГЛОЙ (*GASTEROSTEUS ACULEATUS*) БЕЛОГО МОРЯ В ЛЕТНИЙ ПЕРИОД

СМИРНОВ
Лев Павлович

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
levps@rambler.ru*

СУХОВСКАЯ
Ирина Викторовна

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
sukhovskaya@inbox.ru*

КОЧНЕВА
Альбина Александровна

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ko4neva93@yandex.ru*

Ключевые слова:
колюшка трехиглая
белок
глутатион
глутатион-S-
трансфераза
гваякол-пероксидаза
каталаза

Аннотация: Содержание белка и глутатиона в тканях мальков трехиглой колюшки, а также активность глутатион-S-трансферазы и гваякол-пероксидазы изменялись в процессе роста от июля к августу и отличались у личинок из лагуны Колюшковая от рыб из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма. В губе Сельдяная и проливе Сухая Салма кормовая база достаточна для питания и роста мальков, в то время как биоразнообразие и численность пищевых объектов в лагуне чрезвычайно низки, что оказало негативное воздействие на личинок из лагуны Колюшковая, которое отразилось на весовых характеристиках, накоплении белка и приводило к активации обоих ферментов антиоксидантной защиты (глутатион-S-трансферазы и гваякол-пероксидазы). Изменение таких показателей, как снижение среднего веса, уровня глутатиона и активности глутатион-S-трансферазы, выявленное у личинок из пролива Сухая Салма, связано, вероятно, с более низким температурным режимом в этом биотопе. Поэтому в августе преобладали мальки, вылупившиеся в июле, для которых характерны более низкие значения вышеуказанных показателей.

© Петрозаводский государственный университет

Рецензент: Д. Л. Лайус

Получена: 14 декабря 2018 года

Подписана к печати: 01 июля 2019 года

Введение

Трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* – признанный модельный объект эволюционной биологии и смежных областей (Barber, 2013). В последние годы собрана существенная информация по экологии этого вида в Белом море. Изучена долговременная динамика численности вида (Лайус и др., 2013), роль в трофических цепях (Демчук и др., 2018), морфологическая изменчивость (Доргам и др., 2018). Эти исследования важны для корректной интерпретации других данных, получаемых на колюшке, включая биохимические.

Жизненный цикл *G. aculeatus* включает резкую смену условий обитания, например, в ходе нерестовых миграций из открытого моря в прибрежные и пресноводные биотопы со свойственным им специфическим комплексом абиотических (температура, соленость, состав грунта, скорость течений и др.) и биотических (кормовые объекты, хищники, паразиты) факторов. Нерест колюшки происходит обычно в мае – июне. Молодь в течение июля – сентября пребывает в районе нерестилищ, где активно питается и достигает массы около 150–200 мг и длины тела 25 мм.

На изменение условий среды организм в первую очередь отвечает активацией биохимических систем антиоксидантной защиты. Процессы возникновения свободных радикалов, активных форм кислорода (АФК) и ответных реакций на них в нормальных физиологических условиях в организме сбалансированы. При воздействии различных факторов как экзогенного (физические, химические, биологические), так и эндогенного (дефекты митохондриального дыхания, специфические ферменты) происхождения взаимодействие между прооксидантами и антиоксидантными системами приводит в неустойчивое состояние, при котором баланс может сдвигаться в сторону роста концентрации свободных радикалов и АФК. В этих случаях возникает окислительный стресс, для защиты от которого и предназначена сложная многоуровневая система антиоксидантной защиты, состоящая из низкомолекулярных антиоксидантов, в частности глутатиона (Zhang, Forman, 2012), и комплекса специфических ферментов, в состав которого входят глутатион-S-трансфераза, различные пероксидазы и каталаза.

Изучение вариабельности компонентов антиоксидантной защиты в процессе ак-

тивного роста, когда физиологическое состояние рыбы очень лабильно, а также под воздействием различных факторов внешней среды внесет вклад в понимание фундаментальных основ локальных адаптаций экотермных организмов.

В задачу настоящей работы входило определение концентрации водорастворимого белка, глутатиона, активности глутатион-S-трансферазы, гваякол-пероксидазы и каталазы у молоди колюшки трехиглой, отловленной в июле – августе в трех акваториях Кандалакшского залива Белого моря, отличающихся по условиям среды.

Материалы

Для исследования выбрано три достаточно типичных биотопа, существенно отличающихся условиями среды (табл. 1).

Методы

Сбор и первичная обработка проб. Личинки трехиглой колюшки отловлены 31 июля и 18 августа 2017 г. Немедленно после поимки рыб замораживали в жидком азоте и хранили в нем до начала анализа. Перед анализом мальков взвешивали, затем измельчали ножницами, добавляли буферный раствор 50 мМ трис-НСl, pH 7.5, в соотношении 1:4 (вес:объем) и гомогенизировали в гомогенизаторе Disruptor Genie (USA). Гомогенат центрифугировали при 60000 g 1 час в рефрижераторной центрифуге Allergra 64r (Beckman, USA). Полученный супернатант использовали для экспериментов.

Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли по Hissin, Hilf (1976) с модификациями. Растворимые белки гомогената осаждали с помощью 5 % трихлоруксусной кислоты. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость доводили до pH 8.5 с помощью 5N NaOH, затем добавляли 0.4 М трис-НСl буфер (pH 8.5), содержащий 5 мМ EDTA. Затем в реакционную смесь добавляли 0.01%-ный раствор ортофталевого альдегида (Sigma-Aldrich) в метаноле, приготовленный непосредственно перед использованием. После перемешивания смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем измеряли его флуоресценцию (Em – 420 нм, Ex – 350 нм). Концентрацию глутатиона вычисляли с помощью калибровочного графика, построенного по результатам измерений растворов GSH (Sigma-Aldrich) с концентрацией от 0.5 до 20 мкг/мл (0.0016 до 0.065 μ М/мл) в

Таблица 1. Характеристика мест взятия проб (по Доргам и др., 2018)
Table 1. The description of sampling places (by Dorgam et al., 2018)

Места вылова	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
Географические координаты	66°33'80.66" N, 33°62'25.16" E	66°31'32.62" N, 33°64'59.53" E	66°31'16.96" N, 33°64'73.70" E
Общая характеристика	Треугольная губа с широким входом (глубина около 8 м) и мелководной вершиной	Соединена с морем только в полную воду. Глубина до 4 м	Биотоп с довольно быстрым нарастанием глубины до 5 м
Амплитуда прилива, м	2.5	0.3	2.5
Водная растительность	Фукусы на литорали, очень густая зоостера на большей части акватории	Зоостера в районе, прилегающем к главному входу, в других частях лагуны ее мало. Фукусов практически нет	Фукусы на камнях, разреженная зоостера в более глубокой части
Зоопланктон	Прибрежное сообщество с массовыми для Беломорья видами	Со второй половины июня абсолютное доминирование рачка <i>Acartia longiremis</i> . К концу августа он исчезает	Прибрежное сообщество с массовыми для Беломорья видами

0.4 М трис-НCl буферном растворе (pH 8.5), содержащем 5 мМ EDTA.

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости связывания восстановленного глутатиона (GSH) с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) (Habig et al., 1974). В лунку планшета вносили 225 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мМ CDNB и 1 мМ GSH в 0.125 М фосфатном буфере (pH 6.5). Реакцию начинали добавлением 25 мкл раствора гомогената. Увеличение оптической плотности раствора при длине волны 340 нм фиксировали непрерывно в течение 5 мин при 25 °С с помощью планшетного ридера CLARIOstar Basic Unit (BMG Labtech, Germany). Относительная активность фермента в тканях рыб представлена как количество μM продукта реакции, образовавшегося за минуту в пересчете на мг растворимого белка в ткани ($\mu\text{M}/\text{mg protein} \cdot \text{min}$).

Активность гваякол-зависимой пероксидазной активности (GuPх) определяли по Chance, Maehly (1955) с модификациями. В день анализа готовили реакционную смесь, которая содержала 10 мМ гваякола, 25 мМ перекиси водорода в 0.05 М фосфатном буфере, pH 7.4. Реакцию начинали добавлением реакционной смеси к супернатанту. Измерение проводили при длине волны 470

нм в течение 3 мин при 25 °С на планшетном ридере CLARIOstar Basic Unit. Относительную активность выражали в μM продукта реакции/мг растворимого белка в ткани * мин.

Активность каталазы (CAT) определяли по Beers, Sizer (1952) с модификациями. В день анализа готовили реакционную смесь, которая содержала 25 мМ перекиси водорода в 0.05 М фосфатном буфере, pH 7.4. После добавления супернатанта дегенерацию перекиси водорода измеряли по падению оптической плотности раствора при длине волны 240 нм в течение 3 мин при 26 °С. Относительную активность выражали как $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein} \cdot \text{min}$.

Концентрацию растворимого белка в супернатанте определяли спектрофотометрически по поглощению пептидной связи при длине волны 220 нм при 26 °С (Суховская и др., 2010). Для построения калибровочного графика в день анализа готовили растворы бычьего сывороточного альбумина различной концентрации (0.02–0.1 мг/мл) в буферном растворе 50 мМ трис-НCl, pH 7.5.

Математическую обработку результатов проводили общепринятыми методами (Ивантер, Коросов, 2014). Достоверность различий определяли с помощью непараметрического теста Манна – Уитни (программа Past 3) с поправкой на множественные срав-

нения Беньямини – Хохберга (Benjamini, Hochberg, 2000). Различия считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты

У молоди, отловленной 18 августа в губе Сельдяная, масса тела увеличилась на 20 %

($p = 0.02$) по сравнению с особями, собранными 31 июля (табл. 2). Изначально этот показатель был достоверно ниже, чем у особей из лагуны Колюшковая и пролива Сухая Салма ($p = 0.001$ и $p = 0.01$ соответственно). В двух других биотопах изменение массы тела было несколько иным. В лагуне масса мальков в июле – августе практически не изменилась, а в проливе даже снизилась ($p = 0.03$) и в августе была достоверно ниже, чем у молоди из губы Сельдяная ($p = 0.045$) и июльских мальков из лагуны Колюшковая ($p = 0.006$).

Таблица 2. Масса молоди колюшки (г) в разные месяцы
Table 2. The weight of threespine stickleback juveniles (g) in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
		июль	
Среднее	0.14* ($n = 7$)	0.18 ($n = 7$)	0.18* ($n = 6$)
Ошибка среднего	0.008	0.004	0.008
Медиана	0.14	0.18	0.17
Стандартное отклонение	0.019	0.011	0.019
Минимум	0.11	0.16	0.16
Максимум	0.17	0.19	0.21
		август	
Среднее	0.17* ($n = 7$)	0.17 ($n = 6$)	0.14* ($n = 7$)
Ошибка среднего	0.009	0.007	0.009
Медиана	0.18	0.17	0.14
Стандартное отклонение	0.024	0.017	0.025
Минимум	0.14	0.14	0.12
Максимум	0.21	0.19	0.18

В июле концентрация белка в тканях молоди не зависела от места вылова и имела близкие значения (табл. 3). В августе содержание белка в тканях у мальков, пойманных в губе Сельдяная и проливе Сухая Салма, увеличилось на 13 и 28 % соответственно, а в лагуне Колюшковая осталось без изменений. Оценка по тесту Манна – Уитни не показала статистически значимых различий.

Как видно из табл. 4, уровень GSH в тканях июльских мальков из всех исследованных биотопов в среднем был несколько выше, чем в августе, однако различия статистически недостоверны.

В июле наиболее высокая активность GST (табл. 5) зарегистрирована у личинок из лагуны Колюшковая и пролива Сухая Салма. Тем не менее статистически достоверные различия по этому показателю между осо-

биями из всех трех биотопов отсутствовали. Стоит отметить, то лагуна и пролив соединены между собой и в период прилива между ними происходит водообмен. Возможно, имеет место частичное перемешивание личиночных стад в местах отбора материала.

В августе активность фермента у мальков из лагуны Колюшковая увеличилась в 1.7 раза ($p = 0.006$) по сравнению с июлем. У личинок из губы Сельдяная также отмечен некоторый, но статистически недостоверный, рост активности в августе. Обращает на себя внимание тот факт, что уровень активности GST в тканях рыб из лагуны в августе был достоверно выше, чем у июльских и августовских особей из других биотопов ($p < 0.016$). А у рыб из пролива отмечен противоположный эффект. Активность GST в августе была в 1.8 раза ниже, чем в июле ($p = 0.005$).

Таблица 3. Концентрация водорастворимого белка (мг/мл) у молоди колюшки в разные месяцы
Table 3. The content of water-soluble proteins (mg/ml) in threespine stickleback juveniles in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
июль			
Среднее	57.75 (n = 7)	56.37 (n = 6)	54.71 (n = 12)
Ошибка среднего	5.17	3.12	5.88
Медиана	59.04	56.08	49.34
Стандартное отклонение	12.66	8.24	14.40
Минимум	44.02	44.05	39.75
Максимум	74.02	66.13	79.18
Счет	6	7	6
август			
Среднее	65.06 (n = 7)	57.64 (n = 6)	69.99 (n = 12)
Ошибка среднего	6.11	3.47	8.53
Медиана	60.89	58.04	62.00
Стандартное отклонение	16.18	8.49	29.55
Минимум	43.35	45.17	42.73
Максимум	92.40	67.86	154.01

Таблица 4. Содержание глутатиона (µМ/мг белка) у молоди колюшки в разные месяцы
Table 4. The content of glutathione (µM/mg protein) in threespine stickleback juveniles in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
июль			
Среднее	0.23 (n = 6)	0.24 (n = 7)	0.26 (n = 12)
Ошибка среднего	0.024	0.009	0.021
Медиана	0.23	0.25	0.27
Стандартное отклонение	0.059	0.026	0.052
Минимум	0.15	0.2	0.18
Максимум	0.32	0.28	0.31
август			
Среднее	0.24 (n = 7)	0.23 (n = 6)	0.25 (n = 12)
Ошибка среднего	0.011	0.02	0.008
Медиана	0.23	0.24	0.26
Стандартное отклонение	0.029	0.050	0.027
Минимум	0.20	0.16	0.21
Максимум	0.28	0.3	0.3

Таблица 5. Активность глутатион-S-трансферазы (μM продукта реакции/ mg белка*мин) у молоди колюшки в разные месяцы
 Table 5. The activity of glutathione S-transferase (μM of reaction product / mg protein*min) in threespine stickleback juveniles in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
июль			
Среднее	6.44 ($n = 6$)	7.80 ($n = 7$)	7.17 ($n = 6$)
Ошибка среднего	1.32	0.89	1.07
Медиана	5.38	8.19	8.27
Стандартное отклонение	3.23	2.37	2.63
Минимум	3.22	5.38	3.33
Максимум	11.21	11.31	9.73
август			
Среднее	7.91 ($n = 7$)	13.27* ($n = 6$)	4.32* ($n = 12$)
Ошибка среднего	1.26	1.4	0.55
Медиана	9.33	12.43	3.95
Стандартное отклонение	3.34	3.43	1.89
Минимум	2.7	8.89	1.97
Максимум	11.65	17.32	8.42

Как видно из табл. 6, в июле самый высокий уровень активности GuPх обнаружен у мальков из лагуны Колюшковая, который в 3.0–5.8 раза был выше, чем у рыб из пролива и губы Сельдяная ($p = 0.007$ и 0.003 со-

ответственно). В августе между мальками из лагуны и рыбами из пролива и губы сохранилась трехкратная достоверная разница ($p = 0.005$ и 0.007).

Таблица 6. Гваякол-пероксидазная активность (nM продукта реакции/ mg protein*мин) у молоди колюшки в разные месяцы
 Table 6. The guajacol peroxidase activity (nM of reaction product / mg protein*min) in threespine stickleback juveniles in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
июль			
Среднее	0.11 ($n = 3$)	0.64* ($n = 5$)	0.21 ($n = 6$)
Ошибка среднего	0.018	0.099	0.042
Медиана	0.12	0.70	0.16
Стандартное отклонение	0.03	0.22	0.10
Минимум	0.08	0.03	0.11
Максимум	0.14	0.83	0.35
август			
Среднее	0.19 ($n = 5$)	0.59* ($n = 6$)	0.40 ($n = 8$)
Ошибка среднего	0.038	0.099	0.072
Медиана	0.16	0.58	0.17
Стандартное отклонение	0.09	0.24	0.53
Минимум	0.12	0.29	0.07
Максимум	0.32	0.95	1.67

У мальков из лагуны Колюшковая были более низкие показатели активности каталазы по сравнению с рыбами из двух других биотопов, но статистически значимых различий не обнаружено (табл. 7). По-видимому, существенной разницы по температуре между акваториями на момент взятия материала не было.

Таблица 7. Активность каталазы ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}\cdot\text{min}$) у молоди колюшки в разные месяцы
Table 7. The activity of catalase ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}\cdot\text{min}$) in threespine stickleback juveniles in different months

	Губа Сельдяная	Лагуна Колюшковая	Пролив Сухая Салма
июль			
Среднее	1.03 ($n = 5$)	0.71 ($n = 4$)	0.98 ($n = 5$)
Ошибка среднего	0.14	0.21	0.09
Медиана	1.22	0.87	1.05
Стандартное отклонение	0.32	0.48	0.19
Минимум	0.53	0.52	0.71
Максимум	1.28	1.29	1.16
август			
Среднее	1.04 ($n = 5$)	0.72 ($n = 4$)	1.06 ($n = 10$)
Ошибка среднего	0.22	0.10	0.13
Медиана	0.88	0.68	1.00
Стандартное отклонение	0.49	0.20	0.43
Минимум	0.62	0.52	0.55
Максимум	1.85	0.99	1.78

Обсуждение

Изменение показателей массы за период с 31 июня по 19 августа отличалось у мальков из разных акваторий. Если в губе Сельдяная средняя масса рыб достоверно увеличивалась ($p = 0.02$), то у мальков из лагуны Колюшковая почти не изменилась, а у рыб из пролива Сухая Салма достоверно снижалась ($p = 0.03$). Представляется вероятным, что стадо мальков в губе Сельдяная достаточно однородно, в отличие от двух других биотопов. Отсутствие роста массы у рыб из губы Колюшковая и ее снижения в проливе Сухая Салма может быть связано с тем, что в улове преобладали личинки, вылупившиеся в июле. Установлено (Демчук и др., 2018), что в первой декаде июля численность взрослых колюшек в лагуне Колюшковая была очень низкой (нерест закончился), в то время как в проливе отмечена высокая плотность самцов на 1 м^2 , что указывает на активный нерест. Лагуна и пролив соединены между собой, и во время прилива между ними происходит активный водообмен. Возможно, имело место частичное перемешивание стад в местах отбора материала.

Концентрация водорастворимого белка в тканях обычно используется как вторичный показатель для пересчетов при определении активности ферментов. На наш взгляд, сравнительное изучение вариабельности уровня водорастворимых белков в тканях рыб может дать дополнительную информацию о влиянии различных факторов внешней среды на состояние организма в целом. Несмотря на то что оценка по тесту Манна – Уитни не показала статистически значимых различий между мальками из исследованных акваторий по этому показателю, тем не менее можно предположить, что тенденция к более быстрому росту в августе уровня белка у личинок из Губы Сельдяная и пролива Сухая Салма по сравнению с особями из лагуны Колюшковая связана с кормовой базой данных биотопов. Биоразнообразие зоопланктона в лагуне чрезвычайно низкое, кроме того, к августу численность объектов питания падает до минимальных значений (Демчук и др., 2018), что, вероятно, нашло свое отражение в накоплении белка у колюшек из лагуны Колюшковая.

В качестве неэнзиматического маркера окислительного стресса в клетках использу-

ют такой показатель, как концентрация GSH (Grim et al., 2013). Известно, что при колебаниях температуры окружающей среды изменяется интенсивность окислительно-восстановительных процессов и, соответственно, количества АФК, что отражается на уровне глутатиона в тканях (Yuksel et al., 2008; Суховская и др., 2014). Показано, что у нототений *Notothenia rossii* и *N. coriiceps* в процессе акклимации от 0 до 8 °С концентрация GSH в тканях увеличивалась (Machado et al., 2014). Другой коллектив авторов (Souza et al., 2018), проводивший аналогичные исследования, не выявил статистически значимых изменений в содержании GSH у этих видов рыб. Возможно, отсутствие изменений в содержании GSH в тканях мальков связано с близкими значениями температуры (в диапазоне 21–24 °С) во всех исследованных биотопах в июле и августе.

GSH-зависимые антиоксидантные ферменты, в частности GST и GuPх, используются как маркеры окислительного и температурного стресса (Leggatt et al., 2007; Grim et al., 2013). В августе отмечен рост активности GST у рыб из губы Сельдяная и лагуны Колюшковая. Если у особей из губы изменения были статистически недостоверны, то у мальков из лагуны обнаружено статистически значимое увеличение активности фермента, что может быть связано с ухудшением экологических условий в августе. У мальков из пролива Сухая Салма зафиксировано достоверное снижение активности GST. Природа этого феномена пока неясна. Но можно предположить, что он не связан с температурным режимом акватории вылова. В частности, установлено, что на активность фермента у креветок *Crangon crangon* L. ни температура, ни соленость не оказывали влияния (Menezes et al., 2006). У нототений *N. rossii* повышение температуры на 4° приводило к росту активности GST уже через сутки (Klein et al., 2017). А другими исследователями показано снижение активности фермента у этого вида при повышении температуры (Machado et al., 2014) либо отсутствие реакции (Souza et al., 2018). Сравнительный анализ активности GST в зимний (+12 °С) и летний (+24 °С) периоды у пяти видов рыб, обитающих в Tagus эстуарии в Португалии, показал рост активности при повышении температуры у четырех видов, а у пятого (черный бычок *Gobius niger*) были характерные циклические колебания (Madeira et al., 2013).

GuPх – один из ферментов, защищающих клеточные мембраны от избыточного количества перекиси водорода и перекисного

окисления липидов, превышающих физиологический уровень при различного рода стрессовых воздействиях (Grim et al., 2011), одним из которых является температурный фактор. **При повышении температуры до 8 °С в шестидневном ет дать дополнительную информацию о влиянии различных факторов внешней среды на состояние организма в целом.** Несмотря на то что оценка по тесту Манна – Уитни не показала статистически значимых различий между мальками из исследованных акваторий по этому показателю, тем не менее можно предположить, что тенденция к более быстрому росту в августе уровня белка у личинок из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма по сравнению с особями из лагуны Колюшковая связана с кормовой базой данных биотопов. Биоразнообразие зоопланктона в лагуне чрезвычайно низкое, кроме того, к августу численность объектов питания падает до минимальных значений (Демчук и др., 2018), что, вероятно, нашло свое отражение в накоплении белка у колюшек из лагуны Колюшковая.

CAT – фермент, нейтрализующий перекись водорода, являющуюся одной из АФК, которые возникают в организме в ответ на различного рода стрессовые воздействия, в том числе и температурные. Показано, например, что активность каталазы в мышцах молоди морского окуня *Dicentrarchus labrax* на 15-й день эксперимента при температуре воды 24 °С была в 2 раза выше, чем при 18 °С (Vinagre et al., 2012). В процессе тепловой акклимации у *N. coriiceps* и *N. rossii*, по данным одних авторов, отмечено снижение активности CAT (Forgatti et al., 2017), а по данным других – стимуляции активности CAT не происходило (Klein et al., 2017; Souza et al., 2018). На период сбора материала температура воды в исследованных биотопах не имела существенных различий, поэтому этот фактор не оказывал влияния на активность CAT. У молоди из лагуны Колюшковая среднестатистическая активность фермента была ниже, чем у рыб из других акваторий. Возможно, экологическая обстановка в лагуне оказывает негативное воздействие на мальков. Это видно на примере GST и GuPх, имевших более высокие показатели активности у рыб из лагуны по сравнению с таковыми из других биотопов. Тем не менее обстановка не является критической и не стимулирует образование очень высоких концентраций перекиси водорода в результате окислительного стресса, которые успешно нейтрализуются GuPх и не требуют дополнительной активации каталазы.

Заключение

Экологические условия трех исследованных биотопов Белого моря (губа Сельдяная, лагуна Колюшковая, пролив Сухая Салма) оказали влияние на содержание белка, глутатиона, а также активность GST и GuPx в тканях мальков колюшки трехиглой. Изменения биохимических показателей в процессе роста с июля по август отличались у личинок из лагуны Колюшковая от такового рыб из губы Сельдяная и пролива Сухая Салма. Экологи-

ческая ситуация в лагуне оказывала негативное воздействие на молодь колюшки, выразившееся в отсутствии накопления средней массы, увеличения уровня водорастворимого белка и активации двух ферментов антиоксидантной защиты (GST и GuPx). В проливе Сухая Салма основной нерест колюшки происходит позднее, чем в других акваториях, поэтому в августовском улове преобладали мальки, вылупившиеся в июле, что отразилось на показателях средней массы, уровня глутатиона и активности GST.

Библиография

- Демчук А. С., Иванов М. В., Иванова Т. С., Полякова Н. В., Головин П. В., Лайус Д. Л. Питание беломорской трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) на нерестилищах // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 1–17. DOI: 10.17076/them818.
- Доргам А. С., Головин П. В., Иванова Т. С., Иванов М. В., Савельев П. Д., Лайус Д. Л. Гетерогенность морфологических признаков трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* на разных этапах нереста // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 4. С. 59–73. DOI: 10.17076/them819.
- Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию: Учебное пособие. 3-е изд., испр. и доп. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2014. 298 с.
- Лайус Д. Л., Иванова Т. С., Шатских Е. В., Иванов М. В. «Волны жизни» беломорской колюшки // Природа. 2013. № 4. С. 43–52. <http://ras.ru/publishing/nature.aspx>
- Суховская И. В., Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Бредфорд // Труды КарНЦРАН. Сер. Экспериментальная биология. 2010. № 2. С. 68–71.
- Суховская И. В., Борвинская Е. В., Бахмет И. Н., Немова Н. Н., Смирнов Л. П. Влияние термошока на уровень глутатиона и активность глутатион S-трансферазы в тканях мидии *Mytilus edulis* L. // Труды Карельского научного центра РАН. 2014. № 5. С. 150–156.
- Barber I. Sticklebacks as model hosts in ecological and evolutionary parasitology // Trends Parasitol. 2013. Vol. 29 (11). P. 556–566. DOI: 10.1016/j.pt.2013.09.004.
- Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // Biol. Chem. 1952. Vol. 195. No 1. P. 133–140.
- Benjamini Y., Hochberg Y. On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics // Journal of Educational and Behavioral Statistics. 2000. Vol. 25. No 1. P. 60–83. DOI: 10.3102/10769986025001060
- Chance B., Maehly A. C. Assay of catalase and peroxidases // Methods Enzymol. 1955. Vol. 2. P. 764–775.
- Forgati M., Kandalski P. K., Herrerias T., Zaleski T., Machado C., Souza M. R. D. P., Donatti L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish // J. Comp. Physiol. B. 2017. Vol. 187. P. 1137–1154. DOI: 10.1007/s00360-017-1088-3.
- Grim J. M., Hyndman K. A., Kriska T., Girotti A. W., Crockett E. L. Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. P. 3751–3759.
- Grim J. M., Simonik E. A., Semones M. C., Kuhn D. E., Crockett E. L. The glutathione dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis* // Comp. Biochem. Physiol. 2013. Vol. A 164. P. 383–390.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. No 22. P. 7130–7139.
- Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 74. No 1. P. 214–226.
- Klein R. D., Borges V. D., Rosa C. E., Colares E. P., Robaldo R. B., Martinez P. E., Bianchini A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii* // Journal of Thermal Biology. 2017. Vol. 68. P. 110–118. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.02.016.
- Leggatt R. A., Brauner C. J., Schulte P. M., Iwama G. K. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. Vol. 146. P. 322–328.
- Machado C., Zaleski T., Rodrigues E., Carvalho C. S., Cadena S. M. S. C. G., Gustavo J., Krebsbach P., Rios F. S., Donatti L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii* // Comparative Biochemistry

- and Physiology. Part B. 2014. Vol. 172–173. P. 21–28.
- Madeira D., Narciso L., Cabral H. N., Vinagre C., Diniz M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish // Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 2013. Vol. 166. P. 237–243.
- Menezes S., Soares A. M. V. M., Guilhermino L., Peck M. R. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2006. Vol. 335. P. 114–122.
- Souza M. R. D. P., Herrerias T., Zaleski T., Forgati M., Kandalski P. K., Machado C., Silva D. T., Piechnik C. A., Moura M. O., Donatti L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence // Biochimie. 2018. Vol. 146. P. 43–55. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.
- Vinagre C., Madeira D., Narciso L., Cabral H. N., Diniz M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax* // Ecological Indicators. 2012. Vol. 23. P. 274–279.
- Yuksel S., Asma D., Yesilada O. Antioxidative and methabolic responses to extended cold exposure to extended cold exposure in rats // Acta Biol. Hung. 2008. Vol. 59. No 1. P. 57–66. DOI: 10.1556/ABiol.59.2008.1.5.
- Zhang H., Forman H. J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling // Semin Cell Dev Biol. 2012. Vol. 23. P. 722–728.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках бюджетной темы № 0221-2017-0050 (№ г. р. АААА-А17-117031710039-3) «Биохимические механизмы, определяющие сходство и различия в развитии адаптаций у гидробионтов морских и пресноводных экосистем». Авторы выражают благодарность сотрудникам СПбГУ Д. Л. Лайусу за консультативную помощь, Т. С. Ивановой, М. В. Иванову, Н. В. Поляковой, А. Е. Бахваловой и П. В. Головину за сбор материала.

VARIABILITY OF SOME ANTIOXIDANT DEFENSE PARAMETERS AND CONCENTRATION OF PROTEIN IN THE LARVAE OF THE THREE-SPINED STICKLEBACK (*GASTEROSTEUS ACULEATUS*) IN WHITE SEA IN THE SUMMER

SMIRNOV
Lev Pavlovich

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
levps@rambler.ru*

SUKHOVSKAYA
Irina Victorovna

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
sukhovskaya@inbox.ru*

KOCHNEVA
Albina Aleksandrovna

*Институт биологии Карельского научного центра РАН,
ko4neva93@yandex.ru*

Key words:

threespine stickleback
protein
glutathione
glutathione S-transferase
guaiacol peroxidase
catalase

Summary: The content of protein and glutathione in the tissues of fries of the three-spined stickleback and the activity of glutathione S-transferase and guaiacol peroxidase changed in the process of growth from July to August. They were different in larvae from the lagoon Kolyskovaya, in those from the Bay Seldjanaja and from the channel Sukhaya Salma. In the Bay Seldjanaja and the channel Sukhaya Salma, the food reserve is sufficient for feeding and growth of fries, while the biodiversity and the number of food objects in the Kolyushkovaya lagoon are extremely low. It has a negative impact on the larvae, which affect their weight, protein accumulation, and lead to the activation of both enzymes of antioxidant protection (glutathione S-transferase and guaiacol peroxidase). In the larvae from the channel Sukhaya Salma the decrease in the average weight as well as in the levels of glutathione and activity of glutathione S-transferase were revealed. These changes are probably related to the lower temperature in this biotope. Therefore, in August fries hatched in July prevailed; they are characterized by lower values of the above indicators.

Reviewer: D. L. Lajus

Received on: 14 December 2018

Published on: 01 July 2019

References

- Barber I. Sticklebacks as model hosts in ecological and evolutionary parasitology, Trends Parasitol. 2013. Vol. 29 (11). P. 556–566. DOI: 10.1016/j.pt.2013.09.004.
- Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, Biol. Chem. 1952. Vol. 195. No 1. P. 133–140.
- Benjamini Y., Hochberg Y. On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics, Journal of Educational and Behavioral Statistics. 2000. Vol. 25. No 1. P. 60–83. DOI: 10.3102/10769986025001060
- Chance B., Maehly A. C. Assay of catalase and peroxidases, Methods Enzymol. 1955. Vol. 2. P. 764–775.
- Demchuk A. S. Ivanov M. V. Ivanova T. S. Polyakova N. V. Golovin P. V. Layus D. L. Feeding of the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Linnaeus, 1758) in spawning grounds, Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN. 2018. No. 4. P. 1–17. DOI: 10.17076/them818.
- Dorgam A. C. Golovin P. V. Ivanova T. S. Ivanov M. V. Savel'ev P. D. Layus D. L. Morphological variation of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at different stages of spawning period, Trudy KarNC RAN. 2018. No. 4. P. 59–73. DOI: 10.17076/them819.
- Forgati M., Kandalski P. K., Herrerias T., Zaleski T., Machado C., Souza M. R. D. P., Donatti L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic

- fish, *J. Comp. Physiol. B.* 2017. Vol. 187. P. 1137–1154. DOI: 10.1007/s00360-017-1088-3.
- Grim J. M., Hyndman K. A., Kriska T., Girotti A. W., Crockett E. L. Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish, *J. Exp. Biol.* 2011. Vol. 214. P. 3751–3759.
- Grim J. M., Simonik E. A., Semones M. C., Kuhn D. E., Crockett E. L. The glutathione dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 2013. Vol. A 164. P. 383–390.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249. No 22. P. 7130–7139.
- Hissin P. J., Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Analytical Biochemistry.* 1976. Vol. 74. No 1. P. 214–226.
- Ivanter E. V. Korosov A. V. Introduction in the quantitative biology: study guide. 3-e izd., ispr. i dop. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU, 2014. 298 p.
- Klein R. D., Borges V. D., Rosa C. E., Colares E. P., Robaldo R. B., Martinez P. E., Bianchini A. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*, *Journal of Thermal Biology.* 2017. Vol. 68. P. 110–118. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.02.016.
- Layus D. L. Ivanova T. S. Shatskih E. V. Ivanov M. V. “Waves of Life” of the White Sea stickleback, *Priroda.* 2013. No. 4. P. 43–52. <http://ras.ru/publishing/nature.aspx>
- Leggatt R. A., Brauner C. J., Schulte P. M., Iwama G. K. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells, *Comp. Biochem. Physiol. A.* 2007. Vol. 146. P. 322–328.
- Machado C., Zaleski T., Rodrigues E., Carvalho C. S., Cadena S. M. S. C. G., Gustavo J., Krebsbach P., Rios F. S., Donatti L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B.* 2014. Vol. 172–173. P. 21–28.
- Madeira D., Narciso L., Cabral H. N., Vinagre C., Diniz M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.* 2013. Vol. 166. P. 237–243.
- Menezes S., Soares A. M. V. M., Guilhermino L., Peck M. R. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 2006. Vol. 335. P. 114–122.
- Souza M. R. D. P., Herrerias T., Zaleski T., Forghi M., Kandalski P. K., Machado C., Silva D. T., Piechnik C. A., Moura M. O., Donatti L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence, *Biochimie.* 2018. Vol. 146. P. 43–55. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.
- Suhovskaya I. V. Borvinskaya E. V. Bahmet I. N. Nemova N. N. Smirnov L. P. The influence of thermostress on the level of glutathione and the activity of glutathione S-transferase in mussels *Mytilus edulis* L., *Trudy Karel’skogo nauchnogo centra RAN.* 2014. No. 5. P. 150–156.
- Suhovskaya I. V. Borvinskaya E. V. Smirnov L. P. Nemova N. N. Comparative analysis of the methods for determining protein concentration – spectrophotometry in the range of 200–220 nm and the Bradford protein assay, *Trudy KarNCRAN. Ser. Eksperimental’naya biologiya.* 2010. No. 2. P. 68–71.
- Vinagre P., Madeira D., Narciso L., Cabral H. N., Diniz M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, *Ecological Indicators.* 2012. Vol. 23. P. 274–279.
- Yuksel S., Asma D., Yesilada O. Antioxidative and metabolic responses to extended cold exposure to extended cold exposure in rats, *Acta Biol. Hung.* 2008. Vol. 59. No 1. P. 57–66. DOI: 10.1556/ABiol.59.2008.1.5.
- Zhang H., Forman H. J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling, *Semin Cell Dev Biol.* 2012. Vol. 23. P. 722–728.