

Швед Никита Александрович

**Вителлогенин полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* как биомаркер
эстрогенного загрязнения**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Сяина Ираида Гермогеновна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Жадан Петр Михайлович

доктор биологических наук
Ламаш Нина Евгеньевна

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится 27 декабря в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

Телефон: (423)2310905, факс: (423)2310900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.)

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «_____» ноября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В последние годы резко возрос интерес биологов к проблеме действия ксенобиотиков – химических веществ, загрязняющих окружающую среду вследствие хозяйственной деятельности человека, – на физиологические функции организма, регулирующиеся гормонами. Многие синтетические химические соединения могут имитировать или блокировать действие естественных гормонов, изменять уровень гормонов в крови и тканевых жидкостях. Эти вещества, разрушающие эндокринную систему (endocrine disruptors – EDs), приводят к появлению аномалий развития и нарушению репродуктивной функции человека и животных (Arukwe et al., 2003). Основное внимание уделяется выявлению EDs с эстрогенными свойствами (White et al., 1994; Sonnenschein, Soto, 1998), поскольку их действие приводит к “феминизации” мужских особей – явлению, наиболее часто регистрируемому у морских и пресноводных рыб.

На молекулярном уровне феминизация самцов рыб проявляется в индукции синтеза специфических белков, имеющих особое значение для организма самок, таких как вителлогенин (Vtg). Вителлогенин – димерный гликофосфолиппротеид высокой молекулярной массы (300–600 кДа), предшественник яичного желтка, синтезируется в печени самок рыб под воздействием эстрогенных гормонов (Bieberstein et al., 1999) и транспортируется с кровью в яичники, где поглощается ооцитами в процессе вителлогенеза. Аномальный синтез Vtg у самцов и неполовозрелых рыб может приводить к появлению интерсексов и индуцировать патологические изменения в семенниках, печени и почках.

Для Амурского залива очень актуальной является проблема загрязнения бытовыми и промышленными сточными водами. Спектр загрязняющих воды Амурского залива веществ широк, поэтому постоянно регистрируются новые эффекты загрязнения, в том числе отнесенные к воздействию EDs. Получены результаты о появлении в заливе интерсексуальных особей среди морских безпозвоночных, таких как приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* (Сяпина и др., 1996) и морской еж *Strongylocentrotus intermedius* (Сяпина, Ващенко, 2007).

Вителлогенины разных видов рыб отличаются по молекулярной массе и аминокислотному составу. В связи с этим возникла задача оптимизации существующих методов определения Vtg для выбранного нами вида камбал (*L. pinnifasciata*). Наиболее точным, специфическим и используемым методом количественного определения Vtg в плазме крови является иммуноферментный анализ (ИФА).

Цели и задачи работы

Цель данной работы – разработка специфической иммуноферментной тест-системы для определения Vtg полосатой камбалы *L. pinnifasciata* и проведение мониторинговых исследований по выявлению эстрогенных эффектов загрязнения Амурского залива (зал. Петра Великого Японского моря). Для выполнения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) выделить и очистить вителлогенин полосатой камбалы, подтвердив принадлежность полученного белка к вителлогенинам;
- 2) получить специфичные поликлональные антитела к вителлогенину полосатой камбалы и разработать высокочувствительную тест-систему для его определения на основе оптимизации существующих методов ИФА;
- 3) определить концентрации вителлогенина в плазме крови самок, самцов и ювенильных особей полосатой камбалы из умеренно загрязненной акватории Амурского залива;
- 4) исследовать печень и гонады полосатой камбалы из Амурского залива на наличие патологических изменений; определить встречаемость различных типов изменений печени у половозрелых самок и самцов с разным уровнем вителлогенина в плазме крови;
- 5) оценить эстрогенную активность гексэстрола и смеси полихлорированных бифенилов “Совол” для морских рыб посредством определения содержания вителлогенина в плазме крови и выявления гистопатологических изменений в печени и гонадах камбал при воздействии этих веществ.

Научная новизна

Выделен и очищен Vtg полосатой камбалы *L. pinnifasciata*. Установлено, что аминокислотный состав данного белка сходен с аминокислотным составом вителлогенинов других представителей камбалообразных – белокорогого палтуса *Hippoglossus hippoglossus* и вераспера Мозера *Verasper moseri*. Разработана специфическая и высокочувствительная иммуноферментная тест-система для определения концентраций Vtg в плазме крови *L. pinnifasciata*. Определено содержание Vtg в плазме самок полосатой камбалы в разное время года и на разных стадиях зрелости гонад. Установлено, что в ответ на эстрогенную стимуляцию самцы *L. pinnifasciata* могут синтезировать Vtg в тех же количествах, что и самки. Показано, что ювенильные особи и самцы полосатой камбалы из Амурского залива (зал. Петра Великого Японского моря) синтезируют Vtg, уровень которого в плазме крови может достигать 1 мг/мл, что свидетельствует о наличии в водах залива загрязняющих веществ с эстрогенной активностью. Впервые для камбал из загрязненных акваторий показана корреляция между содержанием Vtg в плазме крови и наличием патологических изменений в печени, при этом встречаемость некроза и кариопикноза гепатоцитов выше у самцов с высокой и у самок с низкой концентрацией Vtg в плазме. Впервые проведена оценка воздействия гексэстрола и смеси полихлорированных бифенилов “Совол” на синтез Vtg у рыб. Показано, что гексэстрол обладает очень высокой эстрогенной активностью, тогда как совол – отсутствием таковой.

Теоретическое и практическое значение работы

Представленные в работе данные подтверждают наличие нескольких типов Vtg у камбаловых рыб, в том числе и у полосатой камбалы *L. pinnifasciata*. Функциональное значение каждого типа Vtg только предстоит изучить. Разработанная иммуноферментная тест-система для количественного определения Vtg в плазме крови полосатой камбалы открывает новые возможности экспериментального выявления эстрогенных свойств у различных химических веществ. У самцов и ювенильных особей *L. pinnifasciata* из Амурского залива выявлены достаточно высокие концентрации Vtg, что свидетельствует о влиянии веществ, обладающих эстрогенной активностью, на эндокринную систему рыб. Впервые для России произведена оценка загрязнения водной среды эстрогенными веществами посредством определения Vtg в плазме крови рыб. Практическое значение работы также связано с возможностью проведения регулярного мониторинга загрязнения прибрежных вод Дальневосточного региона веществами, обладающими эстрогенной активностью, используя широко распространенный вид – полосатую камбалу *L. pinnifasciata*. Результаты работы указывают на наличие нескольких типов Vtg и их дифференцированном синтезе у костистых рыб и могут быть включены в программу курсов по клеточной и молекулярной биологии, ихтиопатологии для высших учебных заведений.

Апробация работы и публикации

Результаты исследований были представлены на Международной научно-практической конференции “Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий” (Владивосток, 2006), XI Международной молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (МЭС ТИБОХ, 2007), научной конференции, посвященной 70-летию С.М. Коновалова (Владивосток, 2008), Международной научной конференции и международной школе для молодых ученых “Проблемы экологии: Чтения памяти проф. М.М. Кожова” (Иркутск, 2010), годовых научных конференциях Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2009, 2010, 2011), X региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России “Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии” (Владивосток, 2011).

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 2 статьи в рецензируемых периодических изданиях, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах печатного текста, иллюстрирована 20 рисунками и 10 таблицами. Список литературы включает 13 отечественных и 219 иностранных источников.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов ДВО РАН 10-III-B-06-132, 11-III-B-06-048 и 09-III-16-04.

Благодарности

Автор считает своим приятным долгом выразить глубокую благодарность своему научному руководителю Сясиной Ираиде Гермогеновне за внимательное, деятельное и конструктивное руководство. Автор выражает благодарность н.с. ИБМ ДВО РАН Кумейко В.В. за неоценимую помощь при освоении методов биохимии. Автор благодарит коллектив лабораторий цитофизиологии и фармакологии ИБМ ДВО РАН за моральную поддержку и создание рабочей атмосферы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект и район исследования. Исследования проводились на полосатой камбале *L. pinnifasciata* (Kner, 1870). Для выделения Vtg использовали 14 рыб, выловленных в ноябре 2007 г., которых содержали в аквариумах. Содержание Vtg было определено у 104 камбал, выловленных в загрязненной части Амурского залива в ноябре 2008 (N=20), октябре 2009 (N=46) и 2010 (N=29), мае 2011 (N=9) годов. Кроме этого, концентрация Vtg определена у опытных камбал, подвергнутых воздействию EDs (N=33). Во всех случаях отбор крови производили в течение 2 ч после отлова рыб.

Биохимические методы. Для получения необходимого количества Vtg его синтез у опытных рыб стимулировали внутрибрюшной инъекцией гексэстрола 0.5 мг на 100 г массы. Плазму гексэстрол обработанных рыб освободили от неорганических ионов посредством колоночной хроматографии на носителе Sephadex G 25 coarse. Очистку Vtg проводили методом ионообменной хроматографии на носителе Q-Sepharose с последующей тонкой очисткой Vtg методом гель-фильтрации на носителе Sephadex G 200. Содержание белка в элюате на всех этапах хроматографической очистки Vtg регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-2550 по оптической плотности растворов. Определение гомогенности Vtg и молекулярной массы его полипептидов определяли методами нативного (Maltais, Roy, 2009) и денатурирующего электрофореза (Laemmli, 1970). Проверку специфичности антител проводили методом вестерн-блоттинга (Towbin, 1984). Идентификацию Vtg осуществили методом масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF MS (анализ проведен в ЗАО "Постгеномные и нанотехнологические инновации" (Москва, Россия)). Поиск первичных аминокислотных последовательностей проведен посредством поискового сервиса Mascot Search в базе данных NCBI.

Для выявления эстрогенной активности двух чужеродных для рыб соединений, гексэстрола и смеси полихлорированных бифенилов, проведены два эксперимента. Особям *L. pinnifasciata*, произвели внутрибрюшинные инъекции; в двух подопытных и двух контрольных группах. В первом эксперименте рыбам вводили раствор гексэстрола на оливковом масле с концентрацией 5 мг/мл в дозе 5 мг вещества на кг массы. Во втором эксперименте использовали смесь полихлорированных бифенилов "Совол". Раствор ПХБ на ФБС с концентрацией 250 нг/мл вводили рыбам из расчета 250 нг ПХБ на кг массы. В обоих экспериментах кровь подопытных и контрольных камбал для определения Vtg в плазме брали через 7 сут после инъекции, одновременно фиксировали образцы тканей печени и гонад в 4% параформальдегиде для последующего гистологического анализа.

Иммунохимические методы. Для получения антисыворотки к Vtg проводили иммунизацию кроликов. Титр антисыворотки определяли методом иммуноферментного анализа (Егоров и др., 1991). Фракцию иммуноглобулинов получали осаждением сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на носителе DEAE-Sepharose. Конъюгацию пероксидазы хрена с IgG проводили периодатным методом (Егоров и др., 1991).

Концентрацию Vtg определяли в плазме крови рыб сэндвич-методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Аликвоту крови 1.5 мл отбирали из жаберной артерии рыб в микропробирки, содержащие 1/10 часть гепарина (активность 5000 МЕ/мл), после чего получали плазму.

Планшет сенсibilizировали IgG кролика к Vtg камбалы в течение. В каждую лунку вносили по 200 мкл раствора IgG с концентрацией 30 мкг/мл в фосфатном буфере, pH 7.4, на 0.9% NaCl с 0.05% твин 20 (ФБС–твин 20). Планшет отмывали от несвязавшихся IgG после

чего возможные свободные сайты сорбции блокировали раствором БСА с концентрацией 5 мг/мл в течение 1 ч при 37°C. Плазму самок *L. pinnifasciata* предварительно разбавляли ФБС–твин 20 в 1500 раз (плазму самцов – от 2 до 50 раз), и далее на отдельном планшете с низкой сорбционной емкостью приготавливали серии разведений до конечного разведения в 192000 раз (плазму самцов раститровывали в 256–64000 раз). Для построения калибровочной кривой использовали серии разведений очищенного Vtg – от 10 мкг/мл до 78.1 нг/мл. Данные серии разведений переносили на планшет с иммобилизованными против Vtg IgG кролика и инкубировали 1 ч при 37°C, после чего производили отмывку планшета. Для оценки связавшегося Vtg на следующем этапе планшет инкубировали 1 ч при 37°C с раствором IgG кролика, конъюгированных с ПХ. Для визуализации результатов анализа добавляли раствор субстрата – ОФДА в фосфат-цитратном буфере, рН 5.0. Реакцию останавливали 5% H₂SO₄ после приобретения раствором стабильной окраски. Измерение оптической плотности проводили на универсальном фотометре для микропланшетов ELx800uv (Bio-Tek Instruments, USA) при длине волны 495 нм.

Для выполнения процедур калибровки метода строили график зависимости оптической плотности продуктов реакции при $\lambda=495$ нм от концентрации Vtg в серии стандартных образцов. Основную часть графика преобразовали в линейную форму проведением десятичного логарифмирования данных по осям абсцисс и ординат. Концентрацию Vtg рассчитывали по формуле:

$$C = (10^x) \times n,$$

где C – концентрация Vtg, мкг/мл; n – степень разведения плазмы; $x = (y-b)/a$, (b и a – коэффициенты линейной регрессии, $y = \text{Lg}D495$). Значениям y соответствовали линейные участки графика зависимости Lg оптической плотности продуктов реакции от Lg концентрации стандартов

Гистологический и морфометрический анализ. У выловленных рыб брали кусочки органов и фиксировали их в жидкости Буэна или 4% параформальдегиде. Далее материал заливали по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилином–эозином. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом OLYMPUS (Япония), фотографировали с помощью цифровой камеры той же фирмы. Патология печени полосатой камбалы была изучена в соответствии с рекомендациями Международного совета по изучению моря (International Council for the Exploration of the Sea, ICES) (Feist et al., 2004). В печени рыб определяли встречаемость гистопатологических изменений, которые в настоящее время приняты как биомаркеры токсического воздействия поллютантов. Повреждения печени классифицировали на основе диагностических критериев, предложенных Хинтоном с соавторами (Hinton et al., 1992; Hinton, 1996). Стадии зрелости гонад камбал определяли на гистологических препаратах на основании признаков, предложенных А. П. Ивановым (1988).

Для морфометрического анализа ооцитов на гистологических препаратах посредством программного обеспечения Тест-Размер 5.0 были измерены площади 50 ооцитов у каждой самки в контрольной (n=5) и опытной (n=6) группах. Диаметр клеток определяли по формуле:

$$D=C/3.14,$$

где C – длина окружности ооцита; D – диаметр клетки.

Статистическая обработка данных. После разработки ИФА для определения концентрации Vtg в плазме крови полосатой камбалы, произвели вычисление внутри- и межэкспериментальной дисперсии. Для расчета внутриэкспериментальной дисперсии на одном 96-луночном микропланшете измерили концентрацию Vtg в 10 сериях разведения очищенного стандарта Vtg в диапазоне концентраций от 152 нг/мл до 2.5 мкг/мл (концентрацию Vtg измеряли для одной степени разведения, концентрация Vtg в которой соответствовала 1.4 мкг/мл). Внутриэкспериментальная дисперсия вычислялась по формуле:

$$\%CV=(SD/M)*100,$$

где %CV – внутриэкспериментальная дисперсия в %, SD – стандартное отклонение, M – средняя концентрация Vtg, вычисленная в 10 сериях разведения.

Для расчета межэкспериментальной дисперсии на восьми 96-луночных микропланшетах в разные дни измерили концентрацию Vtg в 1 серии разведения очищенного стандарта Vtg в

диапазоне концентраций от 152 нг/мл до 2.5 мкг/мл (концентрацию Vtg измеряли для одной степени разведения, концентрация Vtg в которой соответствовала 1.4 мкг/мл). Межэкспериментальная дисперсия вычислялась по формуле:

$$\%CV=(SD/M)*100,$$

где %CV – межэкспериментальная дисперсия в %, SD – стандартное отклонение, M – средняя концентрация Vtg, вычисленная в 10 сериях разведения.

Параллельность кривых разведения стандарта Vtg и образцов плазмы была измерена посредством анализа ковариации (ANCOVA) с помощью программного обеспечения Microsoft office excel 2003. Значения концентраций Vtg в плазме крови рыб были подвергнуты десятичному логарифмированию и сопоставлены между собой посредством программного обеспечения STATISTICA 6. Данные морфометрического анализа обработаны, используя пакет программ GraphPad Prizm методом Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика вителлогенина полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* и разработка иммуноферментной тест-системы для его количественного определения в плазме крови. Для получения очищенного Vtg его выделяли из плазмы крови самок полосатой камбалы, предварительно стимулированных синтетическим эстрогеном – гексэстролом. По данным нашего исследования концентрация белка в плазме крови полосатой камбалы *L. pinnifasciata* увеличилась с 15 до 35.5 мг/мл через 10 сут после инъекции гексэстрола, что отражает закономерности, установленные другими исследователями (Norberg, 1995; Maltais, Roy, 2009; Heppell, Sullivan, 1999).

Профиль элюции ионообменной хроматографии отразил несколько пиков выхода белков (рис. 1 А), элюция Vtg происходила в диапазоне концентраций NaCl 0.35–0.5 М, что в целом соответствует результатам Брайна с соавторами (Brion et al., 2000). При разработке методов выделения Vtg было показано, что элюция белка может начинаться при концентрациях NaCl 0.2–0.4 М (Brion et al., 2000; Hiramatsu et al., 2002; Maltais, Roy, 2009); последний пик профиля элюции при градиенте NaCl от 0–0.05 М до 0.5–0.55 М соответствует Vtg.

Для гель-фильтрации можно использовать Superdex 200 HR (Maltais, Roy, 2009), который является аналогом Sephadex G200, использованного в нашей работе. По окончании гель-фильтрации получен профиль элюции (рис. 1 Б), отразивший один пик выхода Vtg и невысокое плато выхода примесей, что соответствует результатам Брайна с соавторами (Brion et al., 2000).

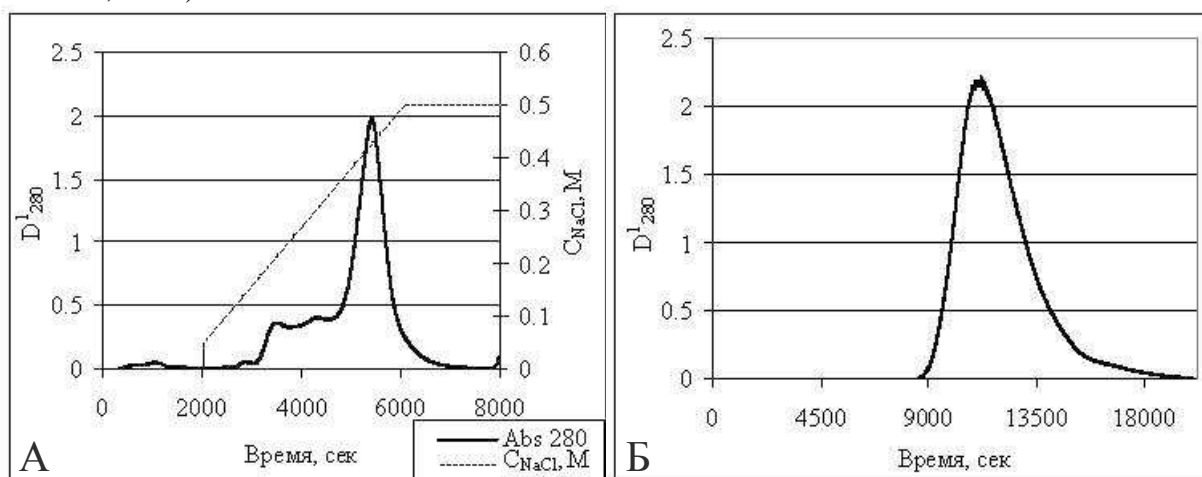


Рис. 1. Хроматографическая очистка Vtg полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata*. А – Профиль элюции раствора белков плазмы крови полосатой камбалы на носителе Q-Sepharose. D¹₂₈₀ – оптическая плотность элюата при λ = 280 нм, C_{NaCl}, М – концентрация NaCl, М. Б – Профиль элюции раствора белков плазмы крови полосатой камбалы на носителе Sephadex G 200. Пик выхода вителлогенина находится между 9000 и 13500 с, плато различных примесей – в диапазоне от 13500 до 20000 с.

Картина электрофоретического разделения Vtg разных видов рыб различается как по массе полипептидов, так и по их количеству. При денатурирующем электрофорезе в присутствии ДДС в восстанавливающих условиях Vtg радужной форели *O. mykiss* распадается на четыре полипептида массой 240, 170, 90 и 30 кДа (Brion et al., 2000). У палтуса *H. hippoglossus* и морского окуня *M. microlepis* при тех же условиях преобладает одна полоса Vtg массой 160 кДа (Norberg, 1995) и 183 кДа (Heppell, Sullivan, 1999) соответственно. Вителлогенин полосатой камбалы *L. pinnifasciata* в присутствии ДДС разделится на несколько полипептидов, масса которых соответствует 180, 98, 70, 52, 41 и 37 кДа (рис. 2). В условиях нативного электрофореза подтверждена гомогенность Vtg. Таким образом, мы установили, что все полипептиды полосатой камбалы, идентифицируемые при денатурирующем электрофорезе, представляют собой единый белковый комплекс, характерный для Vtg.

Молекулярная масса самого тяжелого полипептида Vtg полосатой камбалы (180 кДа) приблизительно соответствует таковой, установленной для других видов камбаловых рыб (от 160 до 205 кДа); наиболее близкие значения выявлены у зимней камбалы *Pleuronectes americanus* (175 кДа) и камбалы-тюрбо *Scophthalmus maximus* (185 кДа), а наиболее значимые отличия – у чилийской камбалы *Paralichthys adspersus* (205 кДа).

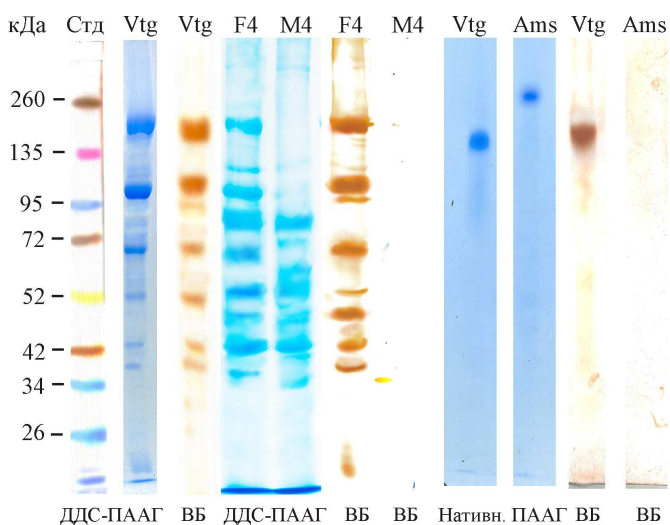


Рис. 2. Картина электрофоретического разделения в денатурирующих (ДДС-ПААГ), нативных (Нативн. ПААГ) условиях и вестерн-блоттинга (ВБ) очищенного вителлогенина (Vtg), плазмы крови самцов (M4) и самок (F4) полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* и амассина (Ams) морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Стд – белки-маркеры молекулярных масс. Отсутствие иммунореакции с плазмой крови самцов и амассином морского ежа указывает на специфичность полученных антител.

Два самых крупных полипептида Vtg с молекулярными массами 180 (Vtg 180 кДа) и 98 кДа (Vtg 98 кДа) были вырезаны из геля и обработаны трипсином для проведения масс-спектрометрического анализа (MALDI TOF MS). В результате анализа трипсинизированных пептидов получены величины отношений массы этих пептидов к заряду (m/z). Величины m/z были использованы для идентификации пептидов и поиска их первичных аминокислотных последовательностей посредством поискового сервиса Mascot Search. По результатам поиска в базе данных NCBI установлено, что наибольшим сходством с Vtg полосатой камбалы обладает Vtg белокорого палтуса *H. hippoglossus* и вераспера Мозера *V. moseri* (табл 1, 2).

Сходство Vtg полосатой камбалы с Vtg белокорого палтуса и вераспера Мозера можно объяснить большой филогенетической близостью подсемейства *Hippoglossinae* (в которое входят *H. hippoglossus* и *V. moseri*) и подсемейства *Pleuronectinae* (к которому относится *L. pinnifasciata*), что было установлено на основании молекулярно-филогенетического исследования камбалообразных рыб по нуклеотидным последовательностям генов цитохрома *B* и цитохромоксидазы 1 (Шарина, Картавцев, 2010). Известно, что Vtg палтуса и вераспера очень сходны по аминокислотному составу. Так, VtgAa и VtgAb вераспера обладают наибольшим сходством с VtgAa и VtgAb палтуса, что было установлено по данным секвенирования этих белков (Reading et al., 2009).

В составе Vtg *H. hippoglossus* присутствуют 17 пептидов с величинами m/z , близкими к таковому, полученным для Vtg 180 кДа и 15 пептидов с m/z величинами, полученным для Vtg 98 кДа *L. pinnifasciata* (табл. 1).

На втором месте по сходству с Vtg *L. pinnifascita* располагаются Vtg вераспера Мозера *V. moseri*. (табл. 2). В базе данных NCBI идентифицированы 26 пептидов Vtg вераспера Мозера, значения m/z которых близки с полученными нами в результате MALDI TOF MS для полосатой камбалы. Причем пептиды Vtg *L. pinnifascita* идентифицированные в полипептиде 180 кДа наиболее характерны для Vtg В *V. moseri*, тогда как пептиды Vtg *L. pinnifascita* идентифицированные в полипептиде 98 кДа наиболее характерны для Vtg А *V. moseri* (рис. 3).

Для проверки результатов MALDI-TOF анализа четыре пептида Vtg *L. pinnifascita* были подвергнуты секвенированию *de novo*. Пептиды IANLDVDMYPR, ALSDWR и YEALLSGLPEEGLAR, FLELIQVLR были обнаружены в полипептидах Vtg массой 180 и 98 кДа соответственно. Данные четыре пептида исследуемого белка полосатой камбалы ранее были установлены для Vtg А и В типов вераспера Мозера.

Таблица 1. Сравнительный анализ величины m/z пептидов, полученных после трипсинизации вителлогенинов белокорого палтуса (Vtg *Hippoglossus hippoglossus*) (данные из <http://www.matrixscience.com>) и полосатой камбалы (Vtg 180 и 98 кДа *Liopsetta pinnifasciata*)

Величина m/z (экспериментальная)		Пептиды Vtg <i>H. hippoglossus</i>
<i>L. pinnifasciata</i>	Vtg <i>H. hippoglossus</i>	
Vtg 180 кДа		
747.4091	746.4018	K.ALSDWR.A*
821.4510	820.4437	K.VVDWMR.G
835.5339	834.5266	K.ALHPELR.M
1057.6847	1056.6774	R.AEGVQEAILK.I
1190.7181	1189.7108	K.THYVISEDVK.A
1223.8428	1222.8355	K.LQLLPVQGIDK.I
1363.8797	1362.8724	K.IASAIVETYAVAR.N
1402.8160	1401.8087	K.VQGYQIAAYFDK.A
1431.7882	1430.7809	R.DQSQEQNEINVK.I
1474.8932	1473.8859	R.ANPTSQPLGSLYVK.F
1506.8564	1505.8491	K.LENQMTLLGQESK.C
1523.8785	1522.8712	K.MIQDIAIQLFMGK.A
1697.0050	1695.9977	R.TYLAGAYADVLEVTGVR.A
1720.9711	1719.9639	K.YEAVLMGGLPEEGLAR.A
1729.8981	1728.8909	K.STDVQEEAEHLACR.C
1755.0312	1754.0239	R.LQVIVANLAENDHYR.I
1977.0663	1976.0590	K.TQNVYELQEPGVQGICK.T
Vtg 98 кДа		
747.3497	746.3425	K.ALSDWR.A*
795.4910	794.4838	K.IPVEPIK.A
835.4720	834.4647	K.ALHPELR.M
850.5750	849.5677	R.VHTIVPGK.I
1009.5527	1008.5455	K.DIGLAYTEK.C
1057.6053	1056.5980	R.AEGVQEAILK.I
1092.5239	1091.5166	K.DCPLYAIIIGK.H
1223.7768	1222.7696	K.LQLLPVQGIDK.I
1363.8040	1362.7967	K.IASAIVETYAVAR.N
1490.7239	1489.7166	K.LENQMTLLGQESK.C
1496.8911	1495.8838	K.LLPGFGSAAANLPLR.V
1523.7984	1522.7911	K.MIQDIAIQLFMGK.A
1720.8843	1719.8771	K.YEAVLMGGLPEEGLAR.A
1792.9485	1791.9412	K.LVDPEIFEYSGIWPK.D
2614.3777	2613.3704	K.DEGIALHAPNHGLQEVFLDLNALK.V

* Неспецифические пептиды, обнаруженные в составе обоих полипептидов вителлогенина полосатой камбалы с молекулярной массой 180 и 98 кДа, выделены жирным шрифтом.

Таблица 2. Сравнительный анализ величины m/z пептидов, полученных после трипсинизации вителлогенинов вераспера Мозера (Vtg *Verasper moseri*) (данные из <http://www.matrixscience.com>) и полосатой камбалы (Vtg 180 и 98 кДа *Liopsetta pinnifasciata*)

Величина m/z (экспериментальная)		Пептиды Vtg В <i>V. moseri</i>
<i>L. pinnifasciata</i>	Vtg Vtg <i>V. moseri</i>	
Vtg 180 кДа		
747.4091	746.4018	K.ALSDWR.A
821.4510	820.4437	K.VVDWMR.G
835.5339	834.5266	K.ALHPELR.M*
1057.6847	1056.6774	R.AEGVQEAILK.I
1223.8428	1222.8355	K.LQLLPVQGIDK.V
1322.7592	1321.7519	K.IANLDVDMYPR.D
1402.8160	1401.8087	K.VQGYQIAAYFDK.A
1431.7882	1430.7809	R.DQSSEQNEINVK.I
1474.8932	1473.8859	R.ANPTSQPLGSLYVK.F
1523.8785	1522.8712	K.MIQDIAIQLFMGK.A
1697.0050	1695.9977	R.TYLAGAYADVLEVTGVR.A
1720.9711	1719.9639	K.YEAVLMGGLPEEGLAR.A
1977.0663	1976.0590	K.TQNVYELQEPGVQGICK.T
Vtg 98 кДа		
835.4720	834.4647	K.ALHPELR.M
850.5750	849.5677	R.IVPLIPAK.L
881.5643	880.5570	K.ILNPVLGR.L
1009.5527	1008.5455	K.DIGLAYTEK.C
1101.6333	1100.6260	R.TEGLQEALLK.N
1130.7249	1129.7177	K.FLELIQVLR.A
1157.6234	1156.6162	R.IMQALSHWR.S
1159.6590	1158.6517	K.LEMEIQVTGPK.A
1182.6358	1181.6285	K.TLYAITEDEK.A
1563.9046	1562.8973	K.SSNQLSATLIATSDR.E
1672.9285	1671.9212	K.AGAFLAGAAADVVEVTGVR.T
1730.9611	1729.9538	K.YEALLLSGLPEEGLAR.A
1792.9485	1791.9412	K.LVEPELFEYSGVWPK.D

* Пептиды, присутствующие в обоих полипептидах полосатой камбалы, выделены жирным шрифтом.

Таким образом, с помощью MALDI-TOF MS анализа, подтверждена принадлежность очищенного белкового препарата, полученного из плазмы крови *L. pinnifasciata* к Vtg.

Перед процедурой определения концентрации Vtg в плазме крови камбал, проведена калибровка иммуноферментного анализа. Трансформирование значений концентраций Vtg и оптической плотности раствора с помощью десятичного логарифмирования позволило получить линейную форму зависимости оптической плотности продуктов реакции от концентрации Vtg в диапазоне от 156 нг/мл до 2.5 мкг/мл. Типичный вид калибровочного графика представлен на рис. 4. Предел определения Vtg составил 156 нг/мл, что вполне соответствует чувствительности подобных методов, разработанных для других видов рыб: 15 нг/мл – для гладкой камбалы *P. putnami* (Roy et al., 2004) и 100 нг/мл – для золотистых бычков *Acanthogobius flavimanus* (Ohkubo et al., 2003) и кумжи *Salmo trutta* (Bjerregaard et al., 2006). Большой предел чувствительности полученный для данного метода в некоторых работах объясняется дополнительным уровнем сэндвича из первичных антител, что увеличивает чувствительность метода. Внутри- и межэкспериментальная дисперсия ИФА для определения Vtg в плазме крови *L. pinnifasciata* составила 10 и 18% соответственно. Данный показатель соответствует таковым в сходных методах количественного определения Vtg в плазме крови: 10 и 20% соответственно (Sumpter, 1985), от 2.4 до 14% для внутриэкспериментальной дисперсии (Li et al., 2006), в пределах 10% для внутри- и межэкспериментальной дисперсии (Anderson et al., 1996; Mills et al., 2001; Scott et al., 2006).

Vtg B

Vtg A

1	MKVIVLALAV	AFAAANQVSL	VPEFALGKTY	VYKYEAVLMG	GLPEEGLARA	1	MRVVALALTL	ALVAGHPQMF	APDFAAGKTF	LYKYEALLLS	GLPEEGLARA
51	GLKVSSEKLI	HAATAADIFML	KLVDPEIFEY	SGIUPKDAFI	PATKLTSLALA	51	GLKVSSEKLI	SAAEQNIHML	KVVEPELFEX	SGVHPKDLV	PATKLTSLALA
101	AQLLTPIKFE	YANGVGVKLF	APAGISTTVL	NILRGINVIL	QNLKTKQNV	101	AQLLTPIKFE	YINGVGVKIM	APEGISLTVL	NIQRGLNVL	QNLKTKQNV
151	YELQEPGVQ	ICKTHVVIS	DVHAERILLT	KTDLMLNCE	RINKDIGLAV	151	YELQEAQAQ	VCKTLXATE	DEKAERILLT	KSRDLNMCV	KIMKDIGLAV
201	TEKCVESCSR	GATLKGVAAP	NYVLRPAATG	ALILEATATE	LIQSPFNIL	201	TEKCIKQQN	LRGAAAYNYI	LKPVANGLI	QEATVMELIQ	FSPFDEHNGA
251	NGAAQMEAKQ	VLTFVDFEKI	PVEPIKAAVL	PRGSVQYFEG	SELLQTPIQ	251	AQHETKQSLV	FLEIQNAPIM	PIKAEYLQK	SLRYEFTSEL	LQNLQLIKI
301	LRIISNAEAQI	VETLHNLVTF	NVAKVHEDAP	LKFIELIQLL	RVARFENIEA	301	KNAQAQIVDI	LNLHLVTHNV	RVHEDAPLKF	LELIQVLR	AAQFDELHLS
351	LWTFQKARP	HRHLLNLAIP	AVGHTHALRF	LKEKFLIGEL	TIAEVAQALL	351	QFNRPAYRQ	WLELATPVIG	TPAALKFIKE	KYLADLELIA	EAAQALIASV
401	ASVHMVTADL	EAIKLVLEGLT	VNPTTIQENPI	LREIVLLGYG	TLVAKYCVEN	401	HMVTASPEAI	KLIEGLAINR	KILEQPLRE	IVLLGYGTHI	SKYCAERTVC
451	PVCPAELVRP	IHELAAEALA	KGKVEELIVL	LKVLGNAGHP	ASLKPILKLL	451	PAELVKPIQE	LLAEAVARAE	TQDTILLKLV	LGNAGHTNSL	KPATKMLPIH
501	PGFGSAAANL	PLRVHIDAVL	ALRNIAKREP	KMIQDIAIQL	FMGKALHPEL	501	GTAASLPHR	VHAEAIMALR	NIAKKEPRHV	QELALQLYND	KALHPELRML
551	RMVSAIVLFE	TKLPHGLVTT	LADALLKERK	LQVVSFVYSY	KRAMTKNTAP	551	ACIVLFEETRP	PVGLVTTLAS	IVKAEENLQV	ASFYTSYMK	HTKNSAIOE
601	DFTSVAACAN	VAVKILSPKF	DRLSYRFSRA	LYNDAYHNPW	VHGAATAFY	601	SVSKACNVAV	KILMPVLR	SLRFSKAVYA	DVYNSPLMLG	AAASAFYIND
651	VNDAAATLMPR	AIVAKARTYL	AGAYADVLEV	GVRAEGVQEA	ILKIQEAPVN	651	AATLLPRSFV	AKAGAFLAGA	AADVVEVGR	TEGLQEALLK	NPAAVDSADR
701	VDRITKMKQV	HKALSDFWRAN	PTSQPLGSLY	VKFFGQEIAP	ANIDKAIKVD	701	ITKMKRIMQA	LSHWRSPNRP	SPLASVYVFK	FGQEIFAFANI	DKALIDQVIS
751	IIELATGPAL	HSYGRKALET	LLSGFALHYA	KPHLVAEVR	IIPTAAGLPH	751	LATAPSAQAL	GRNAVKALLS	GASFNFAPKL	LATEVRRIMP	TAAGLPNELS
801	ELSFYTRAAV	AASVEFQATV	TPTLFANFQA	AQLLKSNDIM	RAAIAPSVSH	801	LYTAAVAAVA	VQIKAITSPV	LPEFHLAHL	LKTDQLEETE	IRPSVAVNTF
851	HTYAVMGVNT	ALLQAALVSR	ARVHTIIPGK	IEARIDMIKG	NFKLQLLPVQ	851	AVHGVNTAIL	QAGLQSRAL	NSILPAKIIA	TLNIQEGHFK	LEVLPVSAPF
901	GIDKVASAIV	ETYAVARNVE	DLAAARITPM	LPATATAQLS	REASMDVDS	901	NIAAVQVDTF	AVARNIEDLA	AARIVPLIPA	KLMQPISRLS	KHSSAAASS
951	VSSFEISQLP	RKLWNILKIP	KGFEEKHCVA	IETFGKACA	EIESHNAASI	951	SRSSEIIFED	VAAAKSSVTP	KATQFAKKYC	SKAVAVGLGK	CVKVAENAA
1001	KDCPLYAIIIG	KHAVLVEVAP	AAGPVVEKIE	IETIQGKAA	EIKLVKINLS	1001	FISDVVLYKH	AGKHSIALSV	TPIEGEEIVK	LEMEIQVQPK	AAEKLRQIN
1051	EEEEILEDKS	ILMKLKKILV	PGLKMNSTSS	SSSSSSSSSS	SSSSSSRRAS	1051	LSEEEIVEGR	PVLMLKLLKIL	APGLKNGSLN	SSSSSSSSAS	SSSSSASSLA
1101	KNVKTSKMLN	SRSSSSSSSS	RSSQRSSRSS	SSSHSKQKLS	ENKFTKNHII	1101	SLSFASSSSS	RSSTRLSKQK	IYRPFKQKNN	KKQQLSQAT	SATPSKSRSS
1151	QHAVSTARAN	SKSSAYSFEA	IYNKAKYLAN	AIPAVTVLII	RAVRADHHPQ	1151	ASSFEDIYQK	NKYLKREATP	VFATILRAIR	ADKKHMGVEL	SVYLDKPTAR
1201	GYQIAAAYFDK	ATARLQVIAA	NLAENDHYRI	CADGVLLSNH	KLMKAIWGI	1201	IQLILALAAA	DDNWKLCADG	VLLSFKVNA	KVGGAGACKQ	YDTMIAETG
1251	ECKQYETEIT	AETGLVGLKP	AFRLKLTWDK	LPKNMORYAK	DLSEYIARIA	1251	LVGPRPAARI	RVAWNNLPTA	LKRYAEKVVN	AIPASHLAGL	IQAKPEKSSN
1301	REAGVSLAKV	KMVMNQLKLT	VAVVSESTLN	VILKTPKPTI	YKLVGPIPS	1301	QLSATLIATS	DRELDLVWKT	PIRVYKLSLR	LPFIALPLDAI	KGLTFFDDAA
1351	LPAQVETAVL	EPYQKNWADK	IHYMLTKAHA	AECTMTKDTV	VTFNMNRKYN	1351	DRVHYHLAKA	GAACECFARD	TLTTFMNRKY	RTFFPLSCYQ	VLAQDCTDEL
1401	EMPHSCYQVL	AQDCSPELKF	IVLLKRDQSQ	EQNEIIVKIA	HLDDVMIHPRD	1401	KFMVLLKKN	IEQNHNIVKI	ADIDIDLYPK	NADVILKVMG	HEIPISNLPY
1451	NAIVVKNVGV	EIPMNNLPYQ	HPEGNIQIRQ	RDEGIALHAP	NHGLQEVFLLV	1451	QHPTAKIQIR	PKEEGISVFA	PSLGLHEVVF	DKNSWVKRVV	DWHKQTCGL
1501	LNALKRVKVD	VNRGQTCGLC	GKADGEIRQE	YRTPNERQIK	NAASYAHSUV	1501	CGKADGEVQQ	EYHTPNGRLT	KNAVSYAHSU	VLPAESCRDT	TECRMKLESV
1551	LPGKSCRDA	ECYNKLASVK	LENQHTLFGQ	ESKCYSEVFP	LRCLPGCHPV	1551	QLQKQLNING	QESKCFVSEV	VLRCLSGCFP	VKTTAVTVGF	HCQPADSAVT
1601	RTTIVTVGFH	CLPADSNMDS	SEGLSSSIYQK	STDIQEEAEA	HLACRCRTAQ	1601	AHNIFDNSVD	LRETAEAHLA	CSSTAHCV		

Рис. 3. Аминокислотная последовательность Vtg B и A вераспера Мозера *V. moseri* (данные по: <http://www.matrixscience.com>). Жирным выделены пептиды, идентифицированные в полипептидах Vtg полосатой камбалы массой 180 кДа (Vtg B) и 98 кДа (Vtg A).

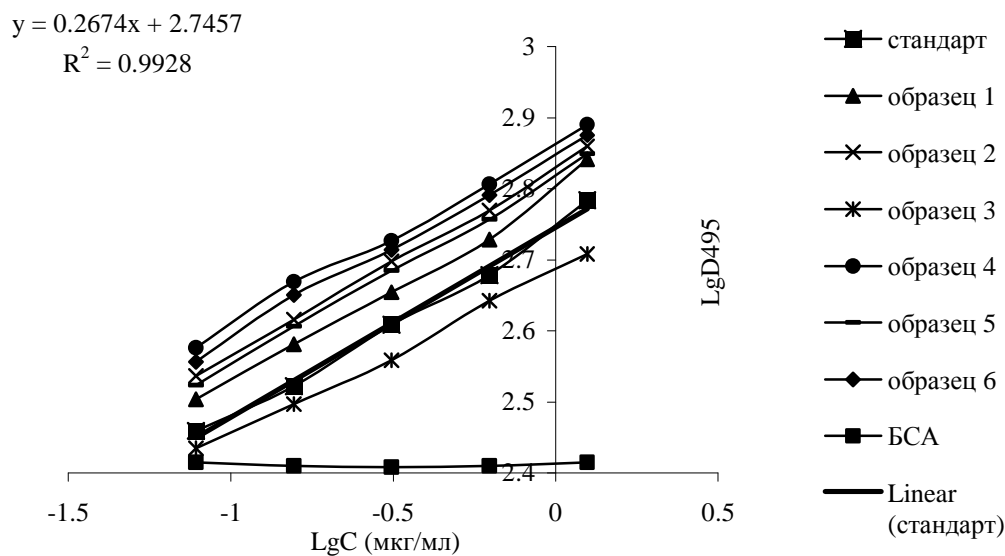


Рис. 4. Калибровочный график для определения концентрации вителлогенина в плазме крови полосатой камбалы *L. pinnifasciata* сэндвич-методом твердофазного иммуноферментного анализа. Линейный участок графика (Linear (стандарт)) соответствует интервалу концентраций вителлогенина от 156 до 2500 нг/мл. Условные обозначения: образец 1–6 – кривые, полученные для разведенных образцов плазмы крови камбал; BSA – кривая разведения бычьего сывороточного альбумина; LgD495 – десятичный логарифм величины оптической плотности при $\lambda = 495$ нм; LgC (мкг/мл) – десятичный логарифм концентрации вителлогенина, нг/мл.

Статистически значимого различия между коэффициентами наклона калибровочной кривой и наклона кривой разведенных образцов плазмы крови выявлено не было (ANCOVA, $F_{6,21}$, $P > 0.05$). Таким образом, следует считать, что линии регрессии параллельны. Коэффициент корреляции линейной регрессии (R^2) для калибровочной кривой составил 0.99.

Содержание вителлогенина в плазме крови и гистопатологические изменения печени камбал из умеренно загрязненной акватории Амурского залива (зал. Петра Великого Японского моря). Концентрация Vtg в плазме крови полосатой камбалы из кутовой части Амурского залива варьирует в течение года и зависит от пола особи, стадии

зрелости гонад и времени года. Так, концентрация Vtg в плазме самок, выловленных в ноябре 2008 г., изменялась от 5.29 до 28.36 мг/мл и составила в среднем 16.38 ± 6.73 мг/мл. Гистологический анализ показал, что все исследованные самки в ноябре находились на IV стадии зрелости гонад (F4). В выборке октября 2009 г. присутствовали как неполовозрелые (F2), так и половозрелые самки. Концентрация Vtg в плазме самок F4 в октябре изменялась от 2.21 до 13.43 мг/мл. В это время года уровень Vtg в плазме самок F2 был достоверно ниже, чем у F4 самок и изменялся от 0.002 до 0.789 мг/мл. Наименьшая концентрация Vtg у взрослых самок (от уровня, находящегося за пределами детекции, до 0.029 мкг/л) зарегистрирована в мае у отнерестившихся рыб (табл. 3). Средняя концентрация Vtg у половозрелых самок, выловленных в ноябре 2008 г. достоверно отличалась от средней концентрацией Vtg в плазме крови самок, выловленных октябре 2009, 2010 и мае 2011 гг. При этом не выявлено достоверных отличий между средней концентрацией Vtg ювенильных (F2) и отнерестившихся (F6) самок, выловленных в октябре 2009 и мае 2011 гг. соответственно (рис. 5).

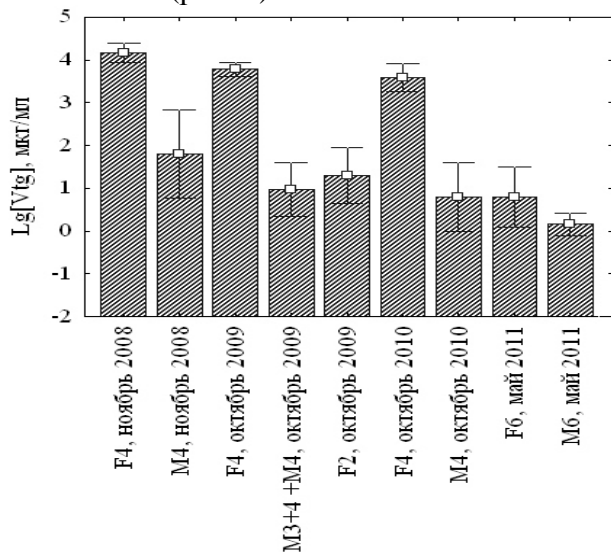


Рис. 5. Уровни вителлогенина в плазме крови полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива. По оси абсцисс – выборки самок (F) и самцов (M) с разной степенью зрелости гонад, по оси ординат – десятичный логарифм средних концентраций Vtg±стандартное отклонение.

Таблица 3. Средние ($M \pm SD$), максимальные ($Max \pm SD$) и минимальные ($Min \pm SD$) концентрации Vtg в плазме самок (F) и самцов (M) полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива, находящихся на разных стадиях зрелости гонад (2008-2011 гг.)

Пол и стадия зрелости гонад	Показатель	Концентрация Vtg, мг/мл			
		ноябрь, 2008	октябрь, 2009	октябрь, 2010	май, 2011
F4	M±SD	16.38±6.73	6.57±2.83	4.99±3.32	-
	Min±SD	5.295±0.7	2.212±0.26	0.40±0.049	-
	Max±SD	28.367±2.8	13.43±0.64	14.00±1.54	-
M3+4	M±SD	0.29±0.42	0.026±0.057	0.037±0.077	-
	Min±SD	НО	НО	0.18±0.026	-
	Max±SD	0.957±0.017	0.244±0.027	0.294±0.031	-
F2	M±SD	-	0.090±0.232	-	0.002±0.004
	Min±SD	-	0.002±0.00056	-	НО
	Max±SD	-	0.789±0.056	-	0.008±0.0009
M2	M±SD	-	-	-	НО
	Min±SD	-	-	-	НО
	Max±SD	-	-	-	НО
F6	M±SD	-	-	-	0.029±0.003
	Min±SD	-	-	-	НО
	Max±SD	-	-	-	0.029±0.003
M6	M±SD	-	-	-	0.008±0.0008
	Min±SD	-	-	-	0.0007±0.00009
	Max±SD	-	-	-	0.0027±0.0002

Примечание. НО – концентрация Vtg находилась за пределами детекции, “-” – в выборке отсутствовали рыбы, находящиеся на данной стадии зрелости.

Вителлогенин также обнаружен и в плазме крови самцов полосатой камбалы из Амурского залива. В ноябре 2008 г. концентрация Vtg в плазме крови самцов М4 изменялась от уровня, находящегося за пределами определения (<156 нг/мл) до 0.957 мг/мл.

В октябре 2009 г. наибольший уровень Vtg у самцов составил 0.244 мг/мл. Стадии зрелости гонад исследованных самцов несколько различались. Так у самцов М4 в семенниках присутствовали только сперматозоиды, тогда как у менее зрелых самцов (М3+4) в ацинусах семенников наряду со сперматозоидами находились и сперматиды. Концентрации Vtg в плазме крови самцов, выловленных в октябре 2009 г., в ноябре 2008 г. и в октябре 2009 г. и находящихся на стадиях зрелости гонад М3+4 и М4, достоверно не различались. В октябре 2010 г. Vtg обнаружен у всех исследованных самцов, его концентрация изменялась от 0.18 до 294 мкг/мл. Концентрация Vtg в плазме крови самок в этот период варьировала от 0.40 до 14.00 мг/мл.

Сравнение концентраций Vtg у неполовозрелых самок и половозрелых самцов не выявило достоверных отличий (рис. 5). Более того, некоторые индивидуальные значения концентраций Vtg у самцов (0.957, 0.932 и 0.432 мг/мл) были выше, чем у неполовозрелых самок.

У камбал, использованных для определения Vtg в плазме крови, изучена встречаемость четырех наиболее распространенных гистологических изменений в печени: вакуолизации гепатоцитов, наличия базофильных включений в цитоплазме гепатоцитов, кариопикноза и некроза гепатоцитов (рис. 6).

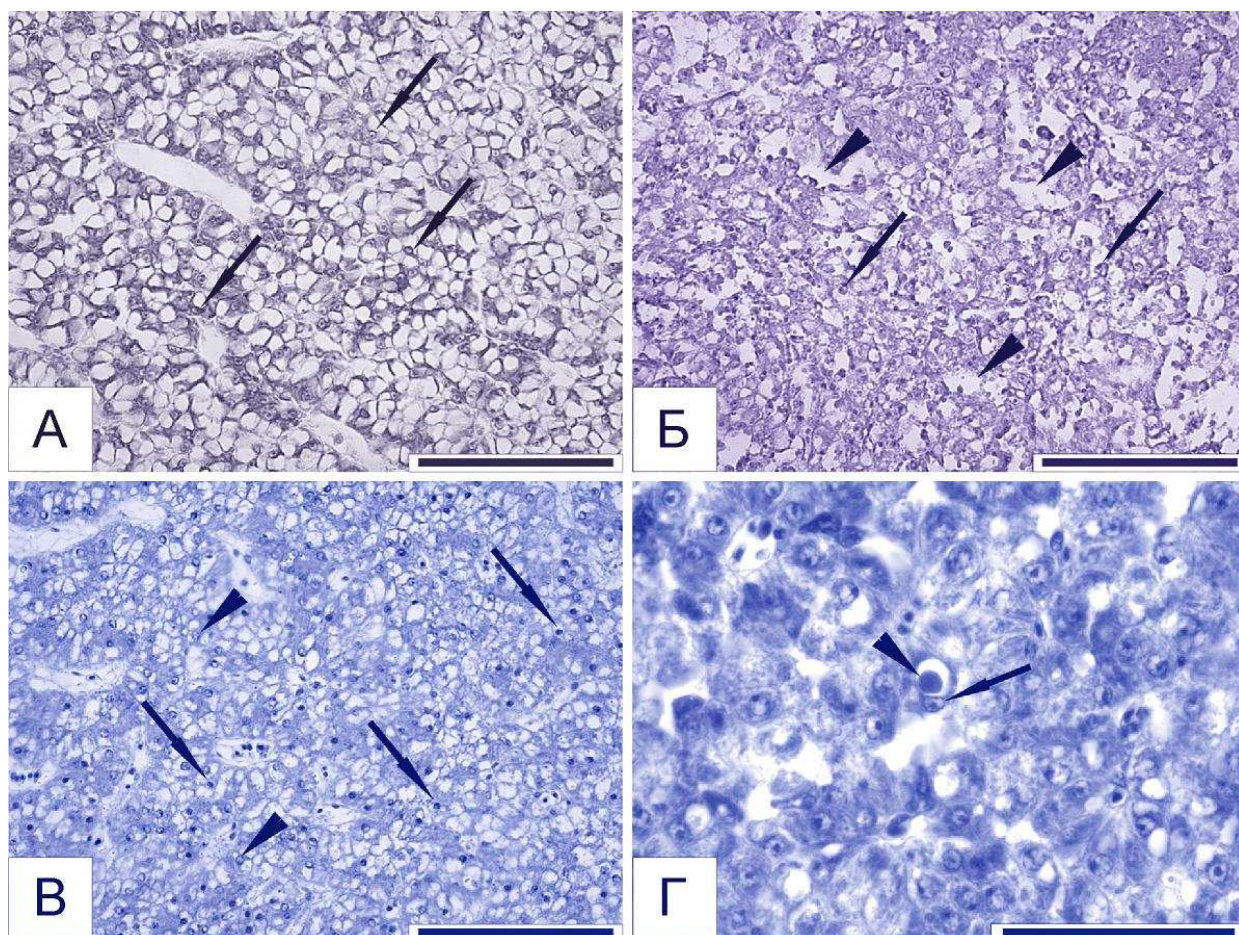


Рис. 6. Основные типы гистологических изменений печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из кутовой части Амурского залива: А – вакуолизация гепатоцитов (стрелки); Б – некроз гепатоцитов, узкие стрелки указывают на пикноз ядер гепатоцитов, широкие стрелки на очаги некроза; В – пикнотизированные (узкие стрелки) и нормальные (широкие стрелки) ядра гепатоцитов; Г – базофильное включение в гепатоците (широкая стрелка), узкая стрелка указывает на ядро гепатоцита. Масштабный отрезок А, Б, В – 100 мкм, Г – 50 мкм

Вакуолизация гепатоцитов найдена у 21% рыб с высоким содержанием Vtg (от 7 до 15 мг/мл) в ноябре 2009 г., и у 75% самок с концентрацией Vtg от 15 до 30 мг/мл в 2008 г. Базофильные включения в цитоплазме гепатоцитов, кариопикноз и некроз гепатоцитов чаще выявляли у самок с низким уровнем Vtg: от 5.5 до 15 мг/мл в 2008 г. и от 2 до 7 мг/мл в 2009 г. (табл. 4). Напротив, частота встречаемости кариопикноза и некроза гепатоцитов была выше у самцов камбал с высокими концентрациями Vtg в плазме.

Таблица 4. Встречаемость (%) гистопатологических изменений печени у самцов (М) и самок (F) полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива с разным уровнем вителлогенина (Vtg) в плазме крови

Гистопатологические изменения печени	2008				2009			
	М		F		М		F	
	Концентрация Vtg в плазме, мг/мл							
	0 – 0.05	0.05 – 1	5.5 – 15	15 – 30	0 – 0.005	0.005 – 0.1	2 – 7	7 – 15
Вакуолизация гепатоцитов	25	12	16	75	5.5	5.5	18	21
Некроз гепатоцитов	0	37	16	0	11	17	7	0
Пикноз ядер гепатоцитов	0	37	16	0	16	28	7	3
Базофильные включения в гепатоцитах	0	0	0	0	0	0	10	0

Концентрация Vtg в плазме крови рыб зависит от нескольких факторов, таких как стадия зрелости гонад и сезон отлова (Aida et al., 1973; Carnevali et al., 1999), режим и состав питания (Davis et al., 2009), температура воды (Hiramatsu et al., 2002; Kirby et al., 2004).

Содержание Vtg в плазме рыб, выловленных в относительно чистых районах, характеризуется следующей закономерностью: концентрация Vtg у половозрелых самок (Vtg_{mF}) > концентрации Vtg у неполовозрелых самок (Vtg_{iF}) > концентрации Vtg у самцов (Vtg_{mM}). Такое соотношение концентраций Vtg в зависимости от пола и зрелости рыб установлено для нескольких видов карповых. Концентрация Vtg в плазме половозрелых самок *S. carpio* изменялась от сотен до тысяч мкг/мл, у неполовозрелых самок она не превышала 200 нг/мл, а в плазме самцов всегда оставалась ниже 20 нг/мл (Tyler et al., 1996). Для полярной камбалы *P. putnami* из эстуария р. Святого Лаврентия (Канада) характерна несколько иная картина распределения концентраций: $Vtg_{mF} > Vtg_{iF} \geq Vtg_{mM}$ (Roy et al., 2004).

У больных или инъецированных гормонами рыб данная схема может быть даже такой: $Vtg_{mM} \geq Vtg_{mF}$. Так, у самцов радужной форели *O. mykiss*, подвергнутых воздействию ксенобиотиков с эстрогенными свойствами, концентрация Vtg была выше (100 мг/мл), чем в норме у половозрелых самок (Purdom et al., 1994).

Для рыб, обитающих в загрязненных водах, немаловажным фактором, влияющим на уровень Vtg, является природа загрязнения, наличие в воде веществ, обладающих эстрогенной активностью, таких как натуральные и синтетические гормоны и их метаболиты (Dube, MacLatchy, 2000; Filby et al., 2006). Помимо этого, у рыб из загрязненных районов отмечены также индивидуальные и сезонные вариации концентраций Vtg в плазме (Jobling et al., 1998; Folmar et al., 2001; Fukada et al., 2001).

Увеличение концентрации Vtg обнаружено в плазме крови самцов рыб, выловленных ниже по течению или в непосредственной близости от водоочистных сооружений (Solé et al., 2001; Bjerregaard et al., 2006; Desforges et al., 2010). В то же время было показано, что концентрации Vtg в плазме самцов камбаловых рыб не зависят от глубины вылова животных, стадии зрелости гонад или возраста (Scott et al., 2007).

В настоящей работе отлов камбал *L. pinnifasciata* осуществляли из умеренно загрязненного района Амурского залива и соотношение концентраций Vtg в их плазме можно характеризовать следующей последовательностью: $Vtg_{mF} > Vtg_{iF} \geq Vtg_{mM}$. Однако в условиях эксперимента при воздействии гексэстрола распределение концентраций Vtg выглядело следующим образом: $Vtg_{mM} \geq Vtg_{mF}$.

Влияние некоторых ксенобиотиков на синтез вителлогенина у самцов полосатой камбалы. Инъекция раствора гексэстрола – синтетического аналога женского полового гормона – в дозе 5 мг/кг привела к значительному увеличению концентраций Vtg в плазме крови у опытных камбал обоих полов.

Средняя концентрация Vtg в плазме самцов контрольной группы составила 0.038 ± 0.053 мг/мл, у самок – 1.00 ± 0.78 мг/мл. Через 7 сут после инъекции гексэстрола средняя концентрация составила 28.51 ± 15.24 мг/мл у самцов и 27.595 ± 6.20 мг/мл у самок. Концентрация Vtg в плазме рыб опытной группы по сравнению с рыбами из контрольной группы увеличилась в несколько раз, при этом достоверных отличий этого показателя у самок и самцов из опытной группы не выявлено ($p > 0.05$) (рис. 7).

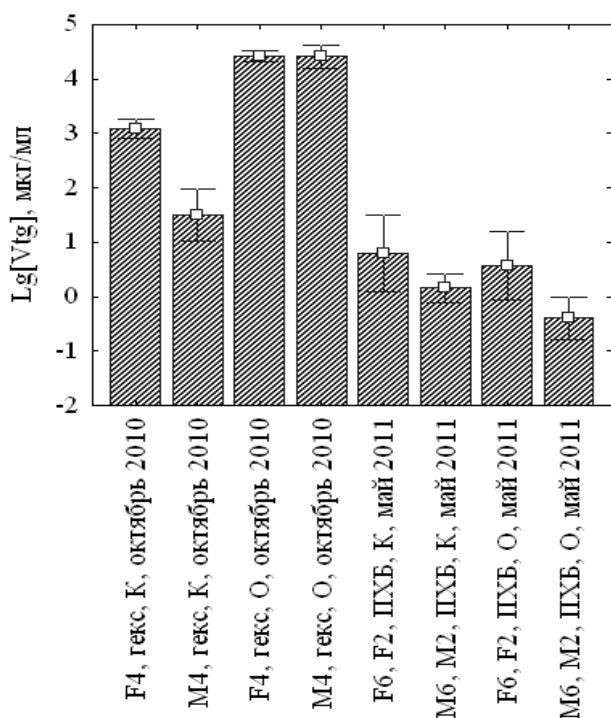


Рис. 7. Уровень вителлогенина в плазме крови полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata*. По оси абсцисс – группы контрольных (К) и опытных (О) рыб при воздействии гексэстрола (гекс) и смеси полихлорированных бифенилов (ПХБ), по оси абсцисс – десятичный логарифм средних концентраций $Vtg \pm$ стандартное отклонение.

В результате анализа картины электрофоретического разделения белков плазмы крови экспериментальных рыб установлено, что увеличение количества Vtg у самок и самцов опытной группы обусловлено появлением (или значительным увеличением концентрации) полипептида массой 98 кДа (рис. 8), соответствующего Vtg А типа вераспера Мозера.

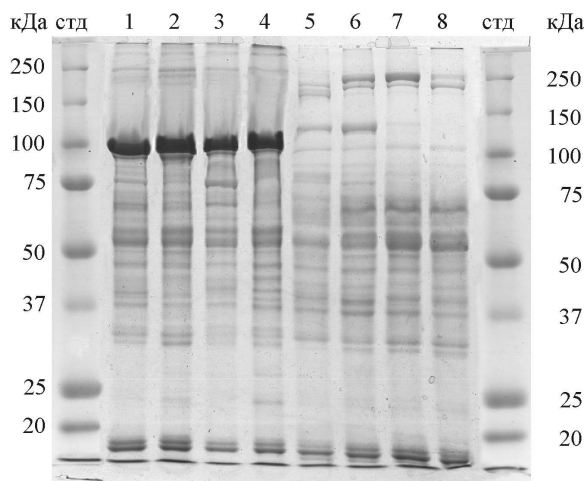


Рис. 8. Индукция синтеза вителлогенина у полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* гексэстролом. В плазме крови избирательно накапливается полипептид с молекулярной массой 98 кДа (соответствует вителлогенину А типа); полипептид массой 180 кДа (соответствует вителлогенину В типа) отсутствует или сохраняется на прежнем уровне. Условные обозначения: стд – маркеры молекулярной массы. 1,2 – плазма крови самцов опытной группы; 3,4 – плазма крови самок опытной группы; 5,6 – плазма крови самок контрольной группы; 7,8 – плазма крови самцов контрольной группы.

Увеличение количества Vtg у полосатой камбалы под действием гексэстрола произошло за счет преимущественного накопления белка, который в условиях денатурирующего электрофореза дает полипептид массой 98 кДа и, как отмечено ранее, обладает большим сходством с Vtg A вераспера Мозера. Таким образом, полученные результаты позволяют говорить об избирательном синтезе, а следовательно, и об избирательной экспрессии лишь одного из генов Vtg в ответ на эстроген. При условиях и дозах, использованных в настоящей работе, у самок и самцов полосатой камбалы синтезировался Vtg A типа. Дифференцированный синтез Vtg разных типов ранее был обнаружен у некоторых видов рыб в природных условиях. Например, у самок вераспера Мозера количественное соотношение Vtg A и Vtg B в плазме составляет 2 : 3 (Matsubara, Koya, 1997). Количественные соотношения между типами Vtg могут меняться в зависимости от стадии зрелости гонад. Так, у самок японской медаки *Oryzias latipes* соотношение Vtg A/B и Vtg C меняется в процессе созревания гонад от 2 : 1 на начальной стадии до 8 : 1 на конечных стадиях вителлогенеза (Matsubara, Koya, 1997)

В гонадах самок камбал, подвергнутых воздействию гексэстрола, выявлены гистопатологические изменения, которые отсутствовали у контрольных рыб. Ооциты контрольных рыб были заполнены желточными гранулами, четко просматривались яйцевые оболочки (рис. 9 А). У всех опытных рыб наблюдалось разрушение отдельных ооцитов, вызванное фрагментацией яйцевых оболочек и выходом желточных гранул за пределы ооцитов (рис. 9 Б).

Таким образом, в результате однократного воздействия гексэстрола отмечено достоверное увеличение концентрации Vtg в плазме камбал опытной группы. Установлено, что самцы полосатой камбалы синтезируют Vtg в тех же количествах, что и самки. Показано разрушение ооцитов камбал, подвергнутых воздействию гексэстрола.

В эксперименте со смесью ПХБ “Совол” использованы рыбы с разной степенью зрелости половых желез. В состав контрольной и опытной групп входили как уже отнерестившиеся, так и молодые созревающие особи, находящиеся на VI и II стадиях зрелости соответственно. В семенниках некоторых самцов наряду со сперматоцитами, обнаружены невыметанные сперматозоиды, стадия зрелости этих камбал определена как М6.

Концентрация Vtg в плазме крови самок контрольной группы, находящихся на VI стадии зрелости, достигала 29.58 мкг/мл, на II стадии зрелости – 8.25 мкг/мл. Средняя концентрация Vtg в плазме самок F2 составила 2.06 ± 4.1 мкг/мл.

Через 7 сут после инъекции смеси ПХБ концентрация Vtg в плазме самок F6 варьировала от 13.18 до 15.80 мкг/мл, что в среднем составило 14.90 ± 1.85 мкг/мл. Концентрации Vtg в плазме самок F6 опытной и контрольной групп достоверно не отличались, возможно, из-за ограниченного числа исследованных особей. Концентрация Vtg в плазме самок F2 опытной группы варьировала от необнаруживаемого уровня до 1.74 мкг/мл, средняя концентрация составила 0.65 ± 0.83 мкг/мл. Достоверных отличий содержания Vtg у самок F2 контрольной и опытной групп также не выявлено (рис. 7).

Средняя концентрация Vtg в плазме самцов М6 опытной группы составила 0.34 ± 0.33 мкг/мл (концентрация изменялась от уровня, находящегося за пределами детекции, до 0.66 мкг/мл), что достоверно не отличается от концентрации Vtg в плазме самцов такой же стадии зрелости в контрольной группе (1.65 ± 0.98 мкг/мл, диапазон от 0.89 до 2.72 мкг/мл). Содержание Vtg у самцов М2 опытной и контрольной групп также не отличалось (рис. 7).

В гонадах контрольных самок более 50% половых клеток приходилось на долю мелких ооцитов протоплазматического роста диаметром от 15 до 75 мкм, что соответствует состоянию яичника полосатой камбалы в это время года. У самок, подвергнутых воздействию совола, выявлено изменение соотношения клеток разных размерных групп с увеличением доли более крупных ооцитов диаметром 105–195 мкм (рис. 10). Средние размеры ооцитов в яичниках ПХБ камбал, подвергнутых действию совола достоверно увеличились ($p < 0.05$) (рис. 11).

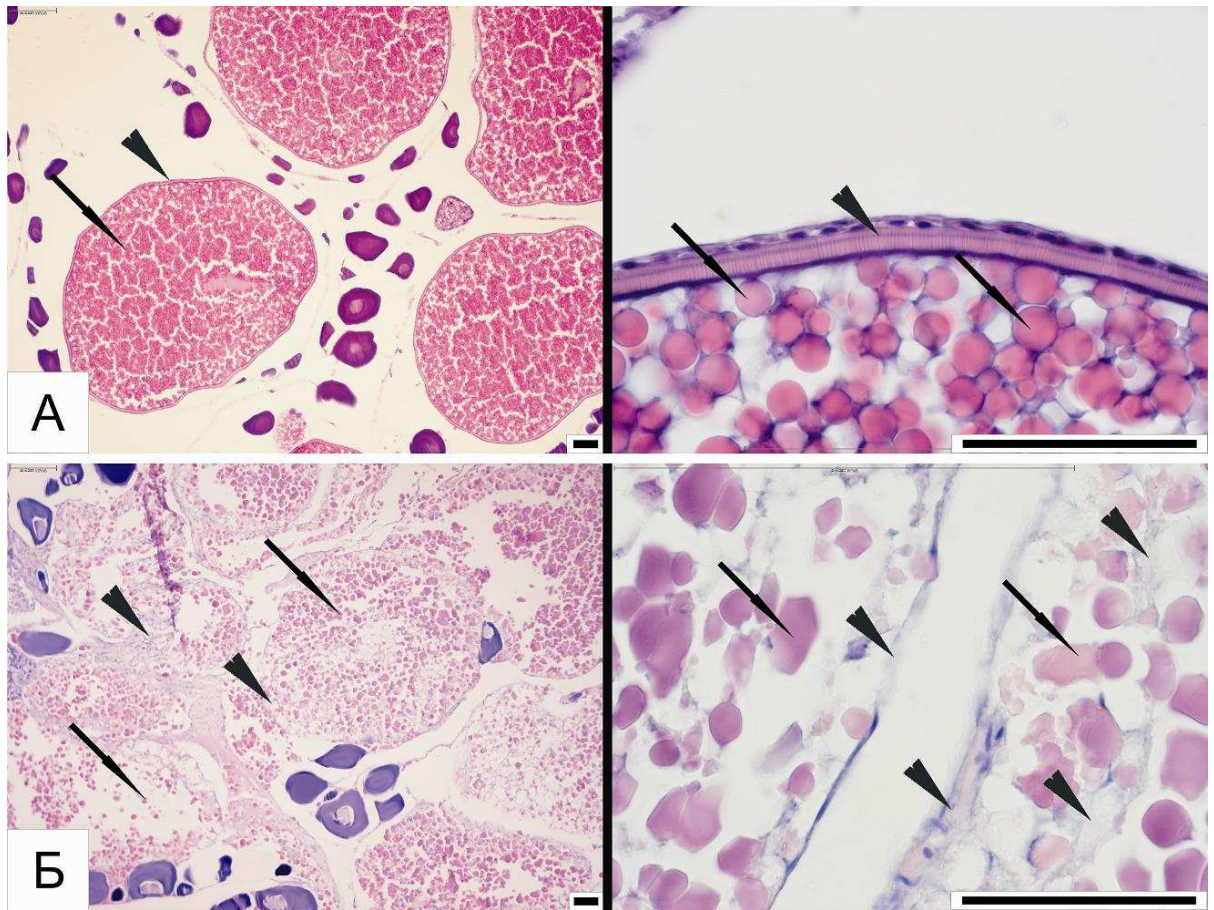


Рис. 9. Морфология ооцитов полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata*. А – ооциты камбал из контрольной группы, Б – разрушение ооцитов рыб, получивших инъекцию гексэстрола в дозе 5 мг/кг. Стрелками указаны желточные гранулы, головками стрелок – яйцевые оболочки. Масштабный отрезок – 50 мкм.

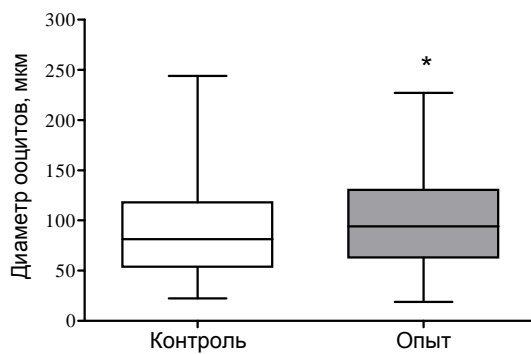


Рис. 10. Диаметр ооцитов в гонадах полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* (поперечная линия – среднее значение, нижняя и верхняя границы прямоугольника – 25 и 75% выборки соответственно, вертикальные линии – минимальное и максимальное значения) при воздействии совола (опыт) и в контроле. *Различия достоверны при $P < 0.05$.

В печени камбал, подвергнутых воздействию ПХБ, выявлены гистопатологические изменения, которые отсутствовали у контрольных рыб. Наиболее значимым было повреждение кровеносного русла, которое выражалось в виде отдельных кровоизлияний вблизи крупных сосудов или же в разрушении капиллярной сети (рис. 12 А, Б), при этом наблюдали деградацию эритроцитов и прилегающей паренхимной ткани печени. Выявлены нарушения в организации печеночных балок, в этих случаях гепатоциты теряли четкие границы (рис. 12 В). У большинства отравленных камбал в ядрах гепатоцитов происходила конденсация и маргинация хроматина (рис. 12 Г).

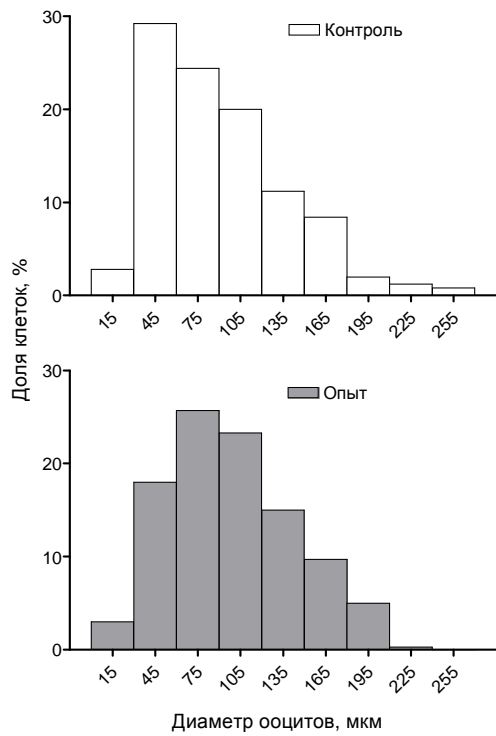


Рис. 11. Изменение соотношения клеток разных размерных групп с увеличением доли более крупных ооцитов диаметром 105–195 мкм в гонадах полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* при воздействии совола (опыт) по сравнению с контролем.

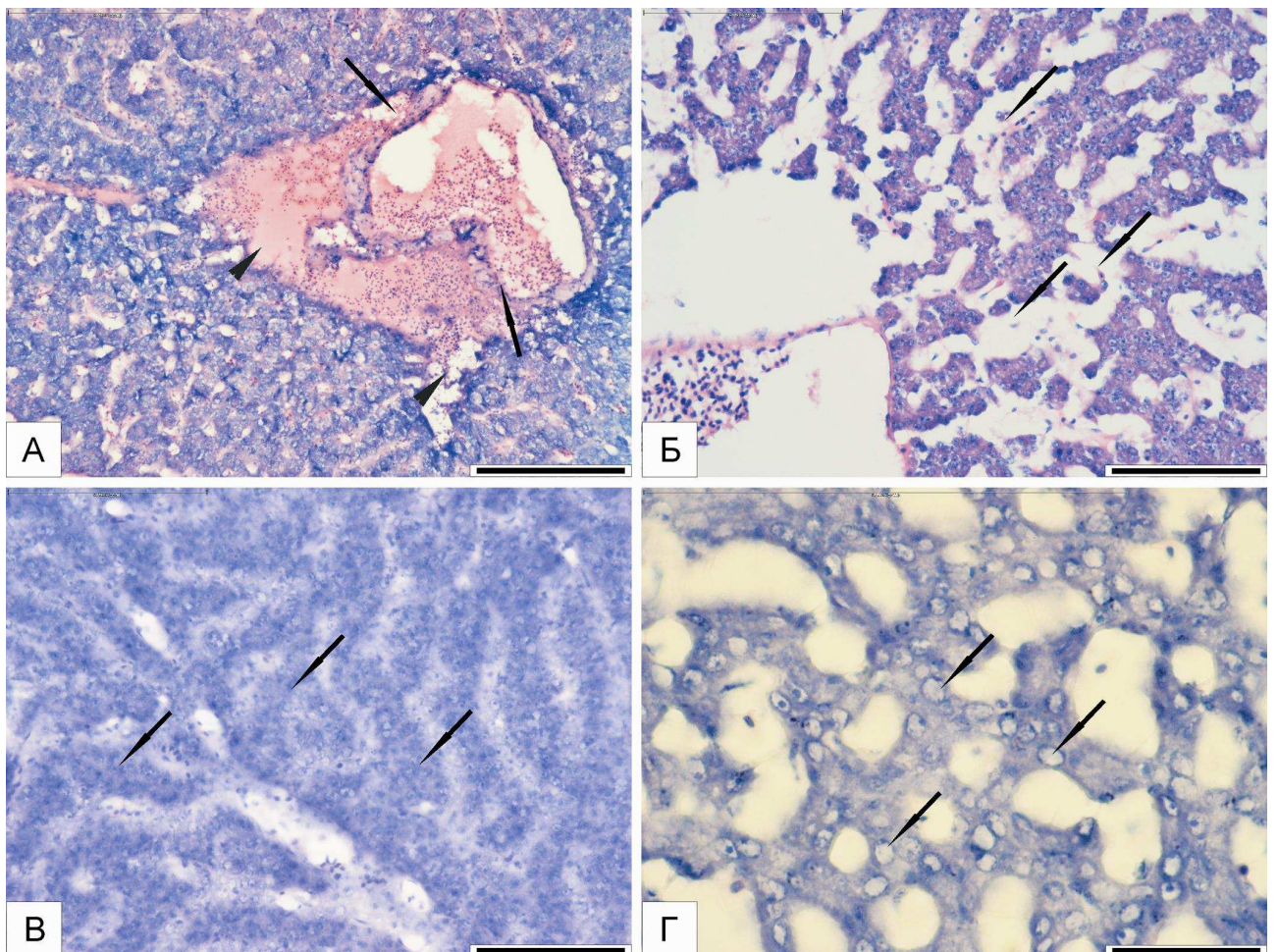


Рис. 12. Патологические изменения печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* при воздействии смеси ПХБ “Совол”: А – кровоизлияние, стрелками обозначена стенка кровеносного сосуда, головками стрелок – участок разрушенной печеночной паренхимы; Б – разрушение капиллярной сети, стрелки указывают на поврежденные кровеносные капилляры; В – потеря четкой структуры у печеночных трубочек (стрелки); Г – конденсация и маргинация хроматина в ядрах гепатоцитов. Масштабный отрезок: А, Б, В – 100 мкм, Г – 50 мкм.

Полихлорированные бифенилы являются стойкими хлорорганическими соединениями технического назначения. В нашей работе по выявлению эстрогенной активности ПХБ был использован совол (смесь ПХБ, в состав которой входит около 20% тетрахлорбифенилов, свыше 50% пентахлорбифенилов, около 20% гексахлорбифенилов) – наиболее распространенный жидкий диэлектрик, используемый в производстве конденсаторов и трансформаторов в Российской Федерации (Мышкин, Бакиров, 2009). При однократном введении совола камбалам в низкой дозе не отмечено изменения концентраций Vtg в плазме крови ни у самок, ни у самцов, что свидетельствует о низкой эстрогенной активности исследованной смеси полихлорированных бифенилов. В настоящее время накоплены противоречивые данные о действии ПХБ на синтез Vtg. Так воздействие ПХБ вызвало экспрессию Vtg у ювенильных особей королевской дорады *S. aurata* (Calo et al., 2010), но не оказало явного эстрогенного эффекта у половозрелых особей белого лаврака *Morone americana* (Monosson et al., 1994).

Таким образом, однократное введение смеси ПХБ “Совол” в достаточно низкой дозе не вызвало достоверного изменения (по сравнению с контролем) концентраций Vtg в плазме крови самок и самцов полосатой камбалы. Выявлено достоверное увеличение размеров ооцитов протоплазматического роста в гонадах опытных самок, что связано с увеличением числа ооцитов диаметром 105–195 мкм. Смесь ПХБ “Совол” оказывает негативное воздействие на состояние печени камбал обоих полов, выражающиеся в виде повреждения кровеносного русла и гепатоцитов, а также нарушения организации печеночных трубочек.

ВЫВОДЫ

1. Выделен и очищен из плазмы крови полосатой камбалы белок, для которого установлена принадлежность к Vtg. В полиакриламидном геле в присутствии ДДС Vtg распадается на полипептиды с молекулярной массой 180, 98, 70, 52, 41 и 37 кДа.
2. Вителлогенин полосатой камбалы обладает наибольшим сходством с Vtg палтуса белокорого и вераспера Мозера. Показано, что пептиды полипептида Vtg полосатой камбалы массой 180 кДа характерны для Vtg В, а пептиды полипептида Vtg полосатой камбалы массой 98 кДа характерны для Vtg А вераспера Мозера.
3. Получены специфичные поликлональные антитела к Vtg полосатой камбалы, на основе которых разработана высокочувствительная иммуноферментная тест-система для его определения в плазме крови в диапазоне концентраций от 156 до 25000 нг/мл.
4. Концентрация Vtg в плазме крови самок полосатой камбалы варьирует в зависимости от стадии зрелости гонад. Наименьшая концентрация Vtg обнаружена у самок, находящихся на посленерестовой стадии репродуктивного цикла, наибольшая – у самок, находящихся на четвертой стадии зрелости гонады (до 30 мг/мл). Ювенильные самки и половозрелые самцы из загрязненной части Амурского залива синтезируются Vtg, его концентрация в плазме крови достигает 1 мг/мл.
5. Встречаемость таких гистопатологических изменений печени, как пикноз ядер и некроз гепатоцитов, выше у самцов с высокими концентрациями Vtg в плазме крови, чем у самцов с более низкими концентрациями Vtg. В противоположность этому у самок с низкими концентрациями Vtg в плазме крови встречаемость кариопикноза и некроза гепатоцитов выше, чем у самок с более высокими концентрациями Vtg.
6. Воздействие гексэстрола вызывает достоверное увеличение концентраций Vtg в плазме крови рыб, обусловленное синтезом полипептида Vtg массой 98 кДа. Самцы полосатой камбалы синтезируют Vtg в тех же количествах, что и самки. Введение гексэстрола вызывает разрушение ооцитов в яичниках.
7. Смесь ПХБ “Совол” не влияет на уровень Vtg ни у самок, ни у самцов полосатой камбалы, но вызывает увеличение диаметра ооцитов и доли более крупных ооцитов в гонадах самок опытной группы, что предполагает стимулирующее действие ПХБ на яичники на ранних стадиях зрелости. Кроме того, смесь “Совол” оказывает негативное воздействие на печень камбал, проявляющееся в виде повреждения кровеносного русла, гепатоцитов и нарушения организации печеночных трубочек камбал, не зависимо от пола.

Список работ по теме диссертации

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК:

1. Швед Н.А., Сясина И. Г., Кумейко В.В. Разработка иммуноферментной тест-системы для определения вителлогенина в плазме крови полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* // Биология моря. 2011. Т. 37, № 3. С. 214–221.
2. Shved N., Kumeiko V., Syasina I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of vitellogenin in plasma and liver histopathology in barfin plaice *Liopsetta pinnifasciata* from Amursky Bay, Sea of Japan // Fish Physiol. Biochem. 2011. Vol. 37, № 4. P. 781–799.

Работы, опубликованные в материалах региональной, всероссийских и международных научных конференций:

3. Сясина И.Г., Высоцкая В.Г., Швед Н.А. Гистопатологические изменения в печени и гонадах полосатой камбалы *Pleuronectes pinnifasciatus* из Амурского залива // Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий: Материалы международной научно-практической конференции. Владивосток: ДВГУ. 2006. С. 188–191.
4. Сясина И.Г., Швед Н.А. Гистологические изменения в печени камбал *Pleuronectes pinnifasciatus* из Амурского залива // XI Международная молодёжная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток: ДВО РАН. 2007. С. 39.
5. Сясина И.Г., Чернова Е.Н., Кумейко В.В., Табакова Е.В., Зюмченко Н.Е., Швед Н.А., Щерблыкина А.В., Высоцкая В.Г. Комплексный биомониторинг состояния камбал и моллюсков из охраняемых и загрязненных районов залива Петра Великого и бухты Киевка (Японское море) // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов – 2: Расширенные материалы Международной научно-практической конференции. Москва: Россельхозакадемия. 2007. С. 419–423.
6. Швед Н.А., Сясина И.Г. Характеристика гистопатологических изменений в печени камбал из районов с разным уровнем антропогенного загрязнения // Современное состояние водных биоресурсов: Материалы научной конференции, посвященной 70-летию С.М. Коновалова. Владивосток: ТИПРО-центр. 2008. С. 686–689.
7. Швед Н.А., Сясина И.Г. Определение вителлогенина в плазме крови и выявление гистологических изменений в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива // Проблемы экологии: Чтения памяти проф. М.М. Кожова: тезисы докладов Международной научной конференции и международной школы для молодых ученых. Иркутск: Изд-во Иркутск. гос. ун-та. 2010. С. 484.
8. Швед Н.А., Сясина И.Г., Кумейко В.В. MALDI-TOF анализ полипептидов вителлогенина полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* // Актуальные проблемы экологии, морской биологии и биотехнологии: Материалы X региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета. 2011. С. 295–300.