

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МЫШЕЧНОЙ
ТКАНИ МОЛОДИ ОБЫКНОВЕННОГО СИГА (*COREGONUS
LAVARETUS PALLASI*) ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА**

Козин А.В., Абрамова Л.С., Гусева Е.С., Беляев В.А., Седлецкий И.В.
ГНЦ РФ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии»

АННОТАЦИЯ

Проведен анализ методом ЯМР-спектроскопии метаболического профиля молоди обыкновенного сига, находящегося в условиях воздействия полиэтилентерефталат (ПЭТ) в среде обитания. Показано, что такие метаболиты, как бетаин, креатинфосфат, инозин, уридин, β -аланин, тирозин, фенилаланин, аспарагин могут являться маркерами оценки влияния микропластика на состояние рыбы. Динамика изменений тирозина, диметилглицина, криатинфосфата, а также бетаина, инозина, саркозина, уридуна, НАД⁺, характеризующих процессы осморегуляции и окислительного стресса, зависит от количества микропластика в среде и наиболее выражена при концентрации 50 мг/л (10 мл частиц) ПЭТ размером 0,4–1,4 мм в водной среде. Установлено, что с увеличением концентрации ПЭТ в среде обитания у молоди сига наблюдается повышение коэффициента АТР/АМР которое, согласно литературным данным, характеризует метаболические расстройства, связанные с дисбалансом питания, кислородного режима, а также в контексте опухолевых заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: микропластик, ЯМР, молодь сига, ПЭТ, метаболомика, нуклеотиды.

ВВЕДЕНИЕ

Растущая распространенность микро- и нанопластика (МП) в окружающей среде вызывает серьезные опасения относительно их потенциальной токсичности, особенно в отношении здоровья живого организма. Микропластиковое загрязнение стало возникать повсеместно в водных средах, в результате сбросов местных и промышленных отходов, стоков очистных сооружений, и рыбохозяйственной деятельности [1]. Микропластики могут загрязнять водные организмы, такие как рыба, различными путями, включая прямое попадание в организм рыб, трофический перенос и абсорбцию. МП были обнаружены в различных частях рыб, включая желудочно-кишечный тракт, жабры и мышечную ткань [2,3]. Механизмы загрязнения мышечной ткани рыбы пока четко не продемонстрированы, хотя некоторые исследования предполагают, что это может произойти, когда проглоченные МП переносятся в съедобные ткани или посредством физической адсорбции через кожные повреждения [4,5].

Исследование микропластиков в мышечной ткани рыбы имеет решающее значение из-за возможности употребления в пищу человеком, поскольку это вызывает опасения по поводу безопасности пищевых продуктов, если, по сообщениям, микропластики накапливаются в мышечной ткани рыбы [2]. Признавая потенциальное воздействие на продовольственную безопасность и здоровье человека контаминации микропластиком рыбы [5], важно решить растущую проблему контаминации микропластика в мышечной ткани рыбы. Однако состояние микропластикового загрязнения в части рыбы остается неясным по сравнению с внутренними органами.

Известно, что накопление микро- и нанопластика вызывает биоморфометрические и поведенческие изменения, влияет на процессы развития и размножения водных организмов.

Биохимические изменения в организме рыб под действием факторов внешней среды происходят за счет метаболических реакций с участием липидов, белков, углеводов и образованием целого ряда таких метаболитов,

как свободные аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды и нуклеозиды, а также структурные липиды, полиненасыщенные жирные кислоты. Это соединения могут использоваться в качестве индикаторов, отражающих влияния среды обитания на изучаемый объект.

Сенсорная система живых организмов имеет огромный и неизвестный набор химических сигналов, которые вызывают разнообразные физиологические и поведенческие реакции. Считается, что одна группа азотсодержащих химических веществ углеродного кольца – нуклеиновые основания – участвует во многих процессах поведения.

Нуклеиновые кислоты – важнейшие органические соединения, хранящие всю информацию об отдельной клетке и организме, определяющие его рост и развитие, а также наследственные признаки, передаваемые следующему поколению. Воздействие на метаболизм нуклеотидов может не только ингибировать возникновение и прогрессирование различных заболеваний, но также вызывать серьезные побочные эффекты. В настоящее время появляется все больше данных, подтверждающих концепцию, согласно которой влияние на метаболизм нуклеотидов может усилить противоопухолевый иммунный ответ путем активации иммунной системы хозяина за счет поддержания концентраций нескольких важных метаболитов, таких как аденоzin и аденозинтрифосфат (АТФ), повышения иммуногенности, вызванной увеличением мутабельностью и нестабильностью генома за счет разрушения пула пуринов и пириимидинов, и высвобождение аналогов нуклеозидов через микробы для регулирования иммунитета. Терапевтические подходы, направленные на метаболизм нуклеотидов в сочетании с иммунотерапией, достигли впечатляющих успехов на доклинических моделях с использованием животных и могут применяться в качестве индикаторов состояния живого организма [6].

Таким образом, основными индикаторами состояния водного биологического объекта под воздействием различных факторов внешней среды, в том числе и микропластика, могут быть следующие соединения:

свободные аминокислоты, органические кислоты, нуклеотиды и нуклеозиды, структурные и запасные липиды, жирные кислоты, особенно полиненасыщенные жирные кислоты.

Для комплексной оценки живого организма перспективным является метаболомика, которая позволяет оценить изменения и выявить индикаторы (метаболиты), отражающие состояние изучаемого объекта под действием различных факторов [7].

ЯМР-спектроскопия является общепризнанным аналитическим методом в метаболомных исследованиях, так дает возможность идентифицировать и количественно определять низкомолекулярные органические соединения в жидкостях и тканях организма [8].

Известно, что энергетический уровень клетки зависит от баланса между аденозинфосфатами, изменение содержания которых используется в качестве индикатора жизнеспособности, повреждения клеток и характеризует влияние различных факторов на состояние организма. Для определения нуклеотидов и нуклеозидов в смеси используются биолюминесцентные, спектрофотометрические, флуоресцентные методы, а также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Преимуществом ВЭЖХ является возможность разделения и одновременного экспрессного определения широкого спектра адениновых нуклеотидов и азотистых оснований в различных биологических средах.

С целью изучения влияния микропластика на состояние организма рыб проведены исследования содержания основных метаболитов в мышечной ткани молоди обыкновенного сига (*Coregonus lavaretus pallasii*) под влиянием микропластика из полиэтилентерефталата (ПЭТ) в лабораторных условиях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для тестирования использовали полиэтилентерефталат (ПЭТ) размером от 0,4 до 1,4 мм.

Молодь обыкновенного сига (*Coregonus Lavaretus Pallasi*) помещали в аквариумы, содержащие ПЭТ в количестве 10 мг/л (2 млн частиц) – группа 1 и 50 мг/л (10 млн частиц) – группа 2, для контроля использовали аквариум без добавления ПЭТ – группа 3.

Рыб кормили коммерческим кормом в количестве 1% от массы рыбы ежедневно. Общее время эксперимента составило 30 дней.

Каждую рыбу отдельно разделяли на филе и проводили экстракцию водорастворимых полярных метаболитов путем гомогенизации мышечной ткани 7,5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) при температуре 4°C в течение 5 мин при 10000 об/мин, затем фильтровали через бумажный фильтр (№ 1). Фильтрат нейтрализовали 9 М раствором KOH до значения pH 7,8, фильтровали через бумажный фильтр (№ 1). Перед определением центрифугировали при температуре 4°C и 12000 об/мин в течение 10 мин и фильтрат использовали для анализа.

Для ЯМР-спектроскопии аликвоту полученного раствора в количестве 500 мкл переносили пипеткой в стандартную ЯМР-ампулу диаметром 5 мм, добавляли 50 мкл раствора TSP (3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt) в D2O с концентрацией 0,5 ммоль/л (в качестве внутреннего стандарта). ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker Avance III (Bruker Biospin GmbH, Германия) с рабочей частотой по протонам 800 МГц при 303 К с раствором ТСП (3-триметилсилил[2,2,3,3-2H4]пропионата натрия) в качестве внутреннего стандарта в ИБХ РАН им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Обработку спектров проводили с использованием программного обеспечения TopSpin 3.6.1 (Bruker BioSpin, США), идентификацию и количественное определение метаболитов — с применением Chenomx NMR Suite 9.02 (Chenomx Inc, Канада), а также сопоставляя международные базы данных: Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>), Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>). Обработку данных проводили при помощи Origin Pro 2021 (OriginLab Corporation).

Количественное определение нуклеотидов и нуклеозидов проводили в экстрактах мышечной ткани рыб на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 с спектрофотометрическим детектором SPD-M20. В качестве подвижной фазы была использована смесь ацетонитрила и 0,1М фосфатного буферного раствора (рН 6,8). Анализ выполняли в режиме градиентного элюирования с использованием колонки размером 250*4,6 мм, размером частиц сорбента 5 мкм. Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Температура колонки 30°C, объем пробы 20 мкл. Скорость потока 1,0 мл/мин. Идентификацию проводили на основе сравнения времени удерживания стандарта с исходной смесью, количественный расчет выполняли методом абсолютной калибровки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типичный $^1\text{H-NMR}$ спектр экстракта мышечной ткани сига обыкновенного представлен на рисунке 1. Для получения полной картины состояния изучаемых объектов, были получены метаболические профили каждого образца, исходя из данных обработки $^1\text{H-ЯМР}$ спектров. Методом главных компонент был проведен анализ различий в наборе данных идентифицированных соединений для трех групп рыб и выяснения роли ПЭТ на их метаболический профиль (рисунок 2).

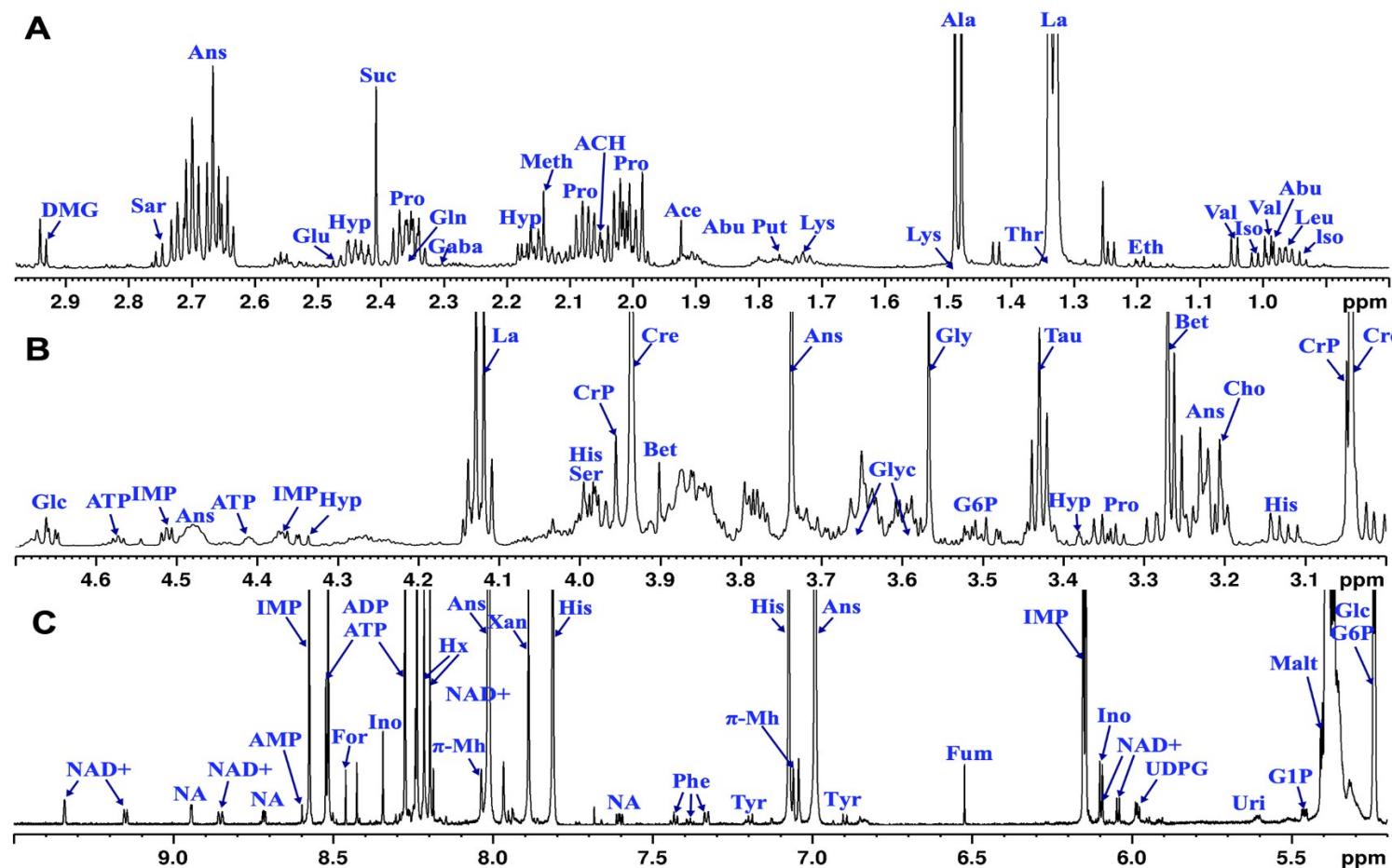


Рисунок 1 - Высокопольная (A), среднепольная (B), and низкопольная (C) области ^1H -NMR спектров экстрактов в ТХУ мышечной ткани (в различных масштабах).

Обозначения:

Abu—2-амиnobутират, Gaba— γ -аминомасляная кислота, AMP—Аденозин-5-монофосфат, ADP—Аденозин-5-динофосфат, ATP—Аденозин-5-трифосфат, Ace—уксусная кислота, Ala—Аланин, Ans—Ансерин, Asn— Аспарагин, Asp—Аспарагиновая кислота, Bet— Бетаин, Cho— Холин, Cre—Креатин, CrP— креатинфосфат, Eth— Этанол, For—Муравьиная кислота, Fum— Фумаровая кислота, Glc—Глюкоза, G1P—Глюкозо-1-фосфат, G6P—Глюкозо-6-фосфат, Glu—Глутаминовая кислота, Gln— Глутамин, Glyc—Глицерол, Gly—Глицин, His—Гистидин, Hx—Гипоксантин, IMP—инозин-5'-монофосфат, Ino—Инозин, Iso— Изолейцин, La—Молочная кислота, Leu—Лейцин, Lys—Лизин, Mal— Малоновая кислота, Malt—Мальтоза, Man—Манноза, Meth—метионин, DMG—N,N-диметилглицин, NAD⁺—Никотинамидадениндинуклеотид, NA—Никотинамид, ACH—O- Ацетилхолин, Phe—фенилаланин, Pro—Пролин, Put—Путресцин, Sar—Саркозин, Ser—Серин, Suc—Янтарная кислота, Tau— таурин, Thr—Threonine, Tyr—Тирозин, UDPG— Уридинифосфат глюкоза, Uri—Уридин, Val—Валин, Xan—Ксантин, Нур— транс-4-гидрокси-L-пролин, β -Ala— β -Аланин, π -Mh— π -метилгистидин. L—длина рыбы, m— масса рыбы

Показано, что исследованные образцы рыб образуют отдельные кластеры, причем наиболее выраженный отмечен для рыб опыта 2. Плотное расположение образцов в кластере свидетельствует о значимом влиянии ПЭТ на состояние рыб в данной группе. Результаты оценки графика нагрузок динамики метаболитов позволили оценить биохимические изменения в организме рыб.

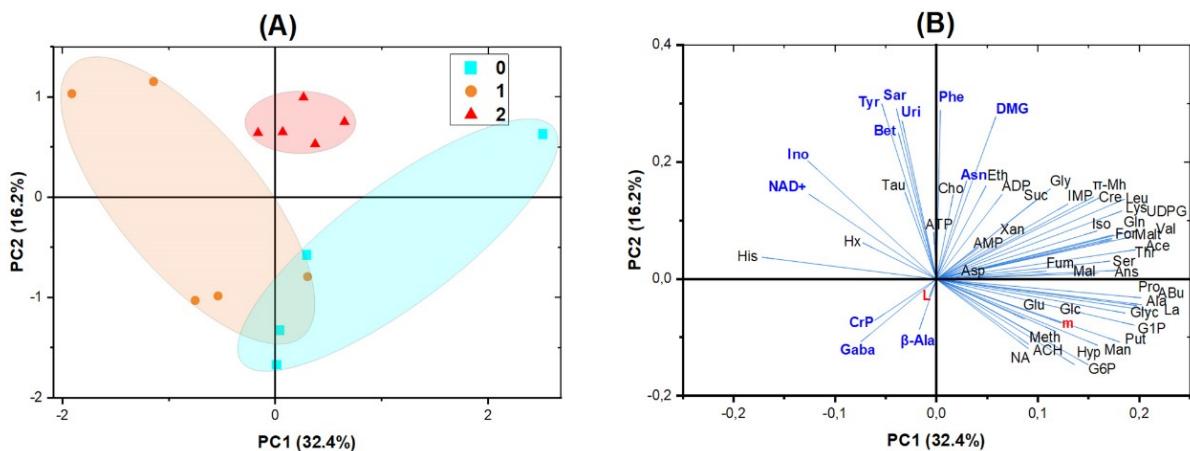


Рисунок 2 - График счетов (А) и график нагрузок (В) длины, массы, содержания метаболитов в образцах трех групп молоди сига.

Сокращения те же, что и на рисунке 1.

Установлено, что для рыб, находившихся в водной среде с концентрацией 10 мг/л (2 млн частиц) ПЭТ (группа 1) и 50 мг/л (10 млн частиц) ПЭТ (группа 2), по сравнению с сигами контрольной группы (группа 0) наблюдаются изменения метаболитов, которые характеризуют нарушение энергетического метаболизма, окислительного стресса и процесса осморегуляции (рисунок 3).

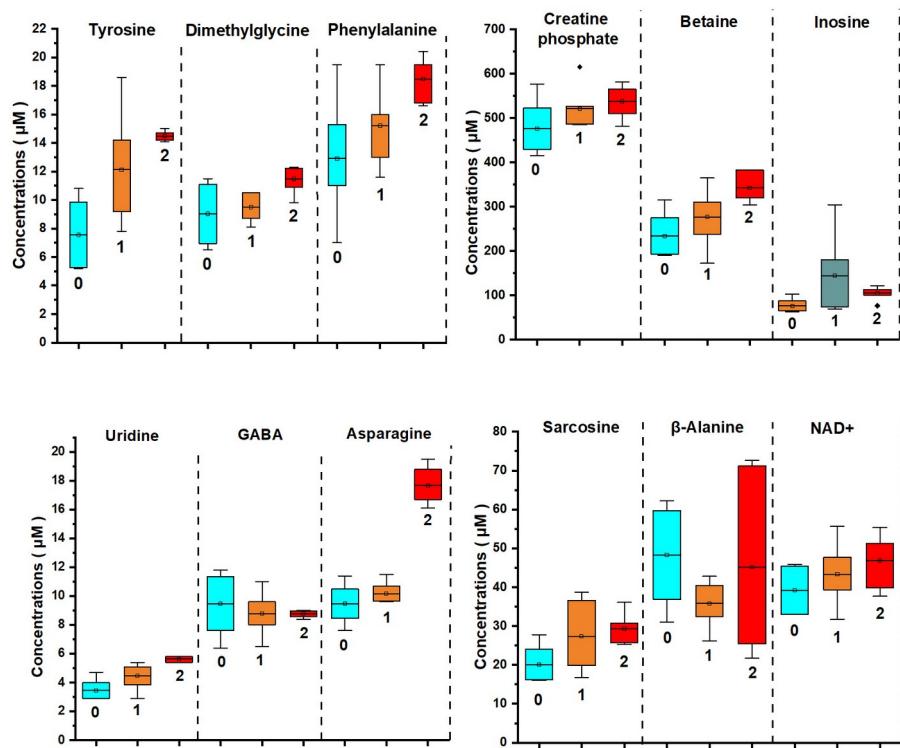


Рисунок 3 - Диаграммы концентрации метаболитов в тканях рыб. Среднее значение представлено сплошной линией ($n = 10$).

С увеличением содержания ПЭТ в среде обитания в мышечной ткани молоди сига обыкновенного наблюдается увеличение содержания бетаина, креатинфосфата, саркозина, NAD^+ , уридуна, а также происходит повышение количества таких аминокислот, как тирозин, диметилглицин, фенилаланин. Существенные изменения в организме молоди сига зависят от концентрации ПЭТ в среде обитания и достоверно отличаются от контрольной группы для группы рыб, находящихся в среде, содержащей ПЭТ 50 мг/л (10 млн частиц).

Для характеристики энергетического метаболизма в трех группах молоди сига было определено количественное содержание АТФ и продуктов его деградации: аденоциндинофосфата (АДФ), аденоцинмонофосфата (АМФ), инозин-5'-монофосфата (ИМФ), инозина (Ино), гипоксантина (Гх). Принципиальная схема механизма деградации адениновых нуклеотидов

приведена на рисунке 4. Однако в живом организме процесс изменения адениновых нуклеотидов протекает по более сложной схеме, поэтому, как правило, используют в качестве показателя не один метаболит, а различные отношения.

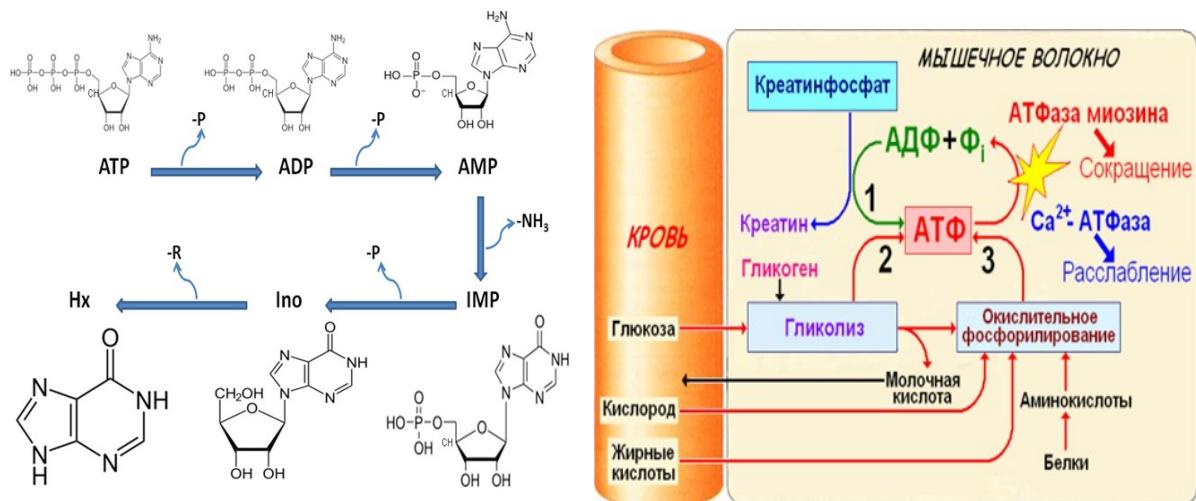


Рисунок 4 – Схема механизма деградации адениновых нуклеотидов

В качестве параметра контроля метаболизма используется энергетический заряд (ЭЗ), представляющий собой долю адениновой кислоты, «заряженной» путем превращения ее в АТФ, является индикатором жизнеобеспечения и повреждения клеток, который рассчитывается по формуле:

$$AEC = \frac{C(ATP) + \frac{1}{2}C(ADP)}{C(ATP) + C(ADP) + C(AMP)}$$

Энергетический заряд аденилат (АЕС) напрямую связан с клеточной концентрацией трех аденилатных нуклеотидов: АТФ, АДФ и АМФ.

Изменение концентраций адениновых нуклеотидов, соотношений АТФ/АДФ и АЕС являются физиологическими маркерами у разных видов живых

организмов. Этот биохимический индекс у позвоночных строго регулируется и поддерживается в узких пределах.

На рисунке 5 приведены данные изменения АЕС, которые свидетельствуют о его повышении с увеличением концентрации ПЭТ в среде обитания, то есть процессы метаболизма характеризуются повышением энергетических затрат с увеличением содержания ПЭТ в среде обитания.

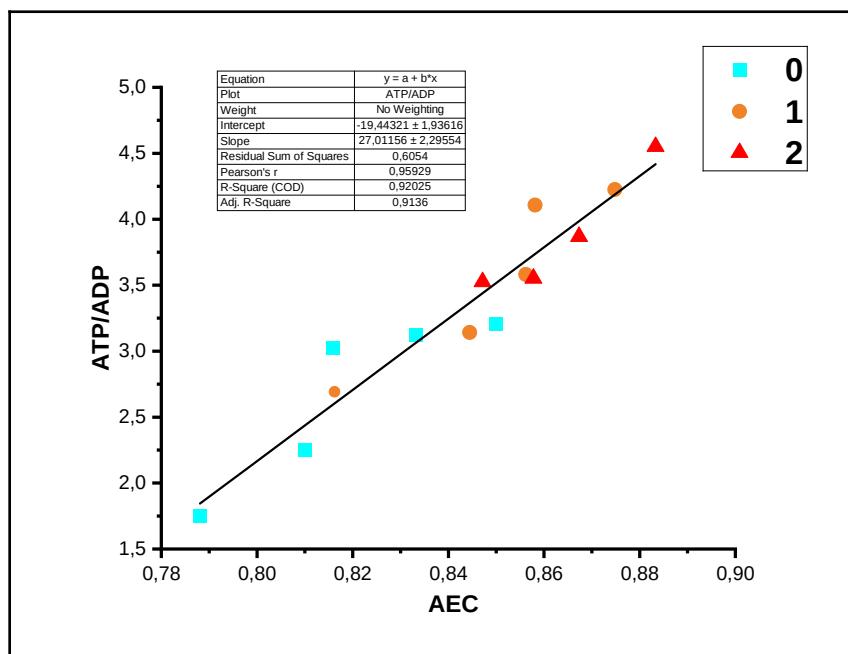


Рисунок 5 - Изменение энергетического заряда аденилата (АЕС) для различных групп молоди обыкновенного сига

Для характеристики энергетического состояния клетки, рассчитан коэффициент АТФ/АМФ (K), связанный с окислительными и энергетическими процессами и исполняющий регуляторную роль.

В клинической и экспериментальной медицине коэффициент АТР/АМР используется как показатель влияния антигипоксантов [9]. Согласно литературным данным с увеличением сроков нарушения кислородного режима от 1 до 4-х часов молярная концентрация АТФ соизмерима с нормой, а содержание АМФ незначительно уменьшается по сравнению с контролем.

Это приводит к возрастанию коэффициента $K = [\text{АТФ}]/[\text{АМФ}]$ в 1,2 раза при 1-часовой экспозиции и в 1,5 раза при экспозиции 4 часа.

Согласно нашим данным, с увеличением концентрации ПЭТ в среде обитания у молоди сига наблюдается повышение коэффициента ATP/AMP (рисунок 6). Следовательно, можно полагать, что наблюдаются метаболические расстройства, связанные с дисбалансом кислородного режима. Кроме того, согласно литературным данным, увеличение коэффициента ATP/AMP характеризует также метаболические расстройства, связанные с дисбалансом питания, наличием опухолевых заболеваний.

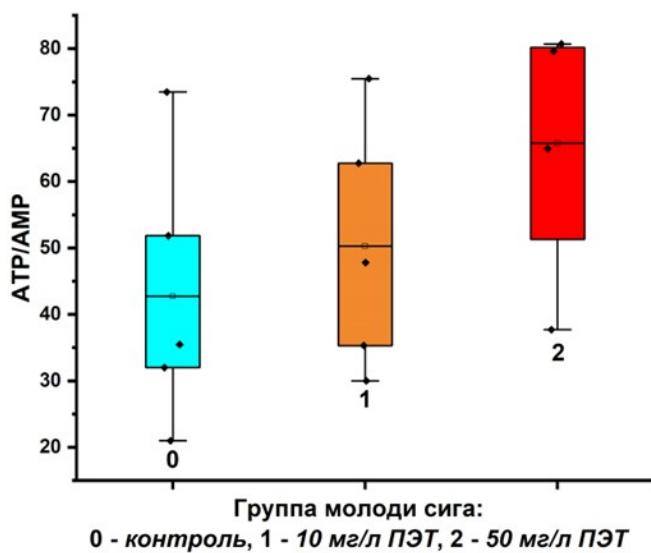


Рисунок 6 - Изменение коэффициента ATP/AMP для различных групп молоди обыкновенного сига

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ методом ЯМР-спектроскопии метаболического профиля молоди обыкновенного сига, находящегося в условиях воздействия полиэтилентерефталат (ПЭТ) в среде обитания.

Показано, что такие метаболиты, как бетаин, креатинфосфат, инозин, уридин, β -аланин, тирозин, фенилаланин, аспарагин могут являться маркерами оценки влияния микропластика на состояние рыбы.

Динамика изменений тирозина, диметилглицина, криатинфосфата, а также бетаина, инозина, саркозина, уридина, НАД $^{+}$, характеризующих процессы осморегуляции и окислительного стресса, зависит от количества микропластика в среде и наиболее выражена при концентрации 50 мг/л (10 мл частиц) ПЭТ размером 0,4–1,4 мм в водной среде.

Изменение содержания нуклеотидов и нуклеозидов характеризует состояние водного организма под влиянием микропластика в среде обитания. Установлено, что с увеличением концентрации ПЭТ в среде обитания у молоди сига наблюдается повышение коэффициента АТР/АМР которое, согласно литературным данным, характеризует метаболические расстройства, связанные с дисбалансом питания, кислородного режима, а также в контексте опухолевых заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jung Y.S., Sampath V., Prunicki M., Aguilera J., Allen H., LaBeaud D., Veidis E., Barry M., Erny B., Patel L., Akdis C., Akdis M., Nadeau K. Characterization and regulation of microplastic pollution for protecting planetary and human health. *Environ Pollut.* 2022; 315:120442. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120442
2. Daniel D.B., Ashraf P.M., Thomas S.N. Microplastics in the edible and inedible tissues of pelagic fishes sold for human consumption in Kerala, India. *Environ Pollut.* 2020; 266(Pt 2):115365. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115365
3. Jaafar N., Azfaralariff A., Musa S.M., Mohamed M., Yusoff A.H., Lazim A.M. Occurrence, distribution and characteristics of microplastics in gastrointestinal tract and gills of commercial marine fish from Malaysia. *Sci Total Environ.* 2021; 799:149457. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149457

4. Abbasi S., Soltani N., Keshavarzi B., Moore F., Turner A., Hassanaghaei M. Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. Chemosphere. 2018; 205:80-87. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.076

5. Barboza L.G.A., Lopes C., Oliveira P., Bessa F., Otero V., Henriques B., Raimundo J., Caetano M., Vale C., Guilhermino L. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. Sci Total Environ. 2020; 717:134625. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134625

6. Wu H.L., Gong Y., Ji P., Xie Y.F., Jiang Y.Z., Liu G.Y. Targeting nucleotide metabolism: a promising approach to enhance cancer immunotherapy. J Hematol Oncol. 2022; 15(1):45. doi: 10.1186/s13045-022-01263-x

7. Zhang L., García-Pérez P., Muñoz-Palazon B., Gonzalez-Martinez A., Lucini L., Rodriguez-Sánchez A. A metabolomics perspective on the effect of environmental micro and nanoplastics on living organisms: A review. Sci Total Environ. 2024; 932:172915. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172915

8. Cappello T. NMR-based metabolomics of aquatic organisms // eMagRes. 2020; 9, 81:100. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1604>

9. Мошкова А. Н., Ерлыкина Е. И., Хватова Е. М., Тежикова Н. П. Исходные характеристики содержания адениновых нуклеотидов в условиях острого кислородного голодания методами математического анализа. Труды НГТУ им. Р.Е. Алексеева. 2015; 1(108): 274-282.