

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И. Д. ПАПАНИНА РАН

**В. В. Кузьмина**

**ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ**

**НОВЫЕ ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ**

Ярославль  
2018

УДК 597  
ББК 28.693.32  
К89

*Ответственный редактор:*  
доктор биологических наук, профессор Ю. В. ГЕРАСИМОВ  
*Рецензенты:*  
член-корреспондент РАН Н. Н. НЕМОВА,  
доктор биологических наук, профессор В. Т. КОМОВ

**Кузьмина, Виктория Вадимовна.**

К89 Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы. Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН. – Ярославль: Филигрань, 2018. – 300 с. – Библ. 790. Илл. 50. Табл. 30.  
ISBN 978-5-6042063-0-0

В книге впервые с позиций современной трофологии систематизированы сведения о процессах пищеварения у рыб. Критически рассмотрены сведения о механизмах пищеварения у рыб. Особое внимание уделено механизмам индуцированного аутолиза и симбионтного пищеварения, а также их вкладу в процессы деградации пищи. Большое место в работе занимают вопросы, касающиеся влияния природных и антропогенных факторов на активность и характеристики пищеварительных гидролаз. Значительное внимание уделено мультифункциональности пищеварительной системы и полипотентности пищеварительных гидролаз, а также предложенной ранее классификации физиологических адаптаций. Описаны адаптации пищеварительной системы на разных уровнях организации материи – от молекулярного до биоценотического уровня.

Монография рассчитана на биологов, особенно ихтиологов, гидробиологов, физиологов, биохимиков, экологов, специалистов в области трофологии и широкий круг читателей, интересующихся проблемами питания.

*Книга печатается по решению Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской Академии наук (ИБВВ РАН) протокол № 9 от 23 октября 2018 г.*

УДК 597  
ББК 28.693.32

ISBN 978-5-6042063-0-0

© Кузьмина В. В., 2018

УДК 597  
ББК 28.693.32  
К89

*Contributing Editor:*

Sc.D., professor YU. V. GERASIMOV

*Reviewers:*

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences N. N. NEMOVA,

Sc.D., professor V. T. KOMOV

**Kuz'mina, V. V.**

K89 Digestive Processes in Fish. New Facts and Hypotheses. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS. – Yaroslavl: Filigran', 2018. – 300 p. – Ref. 790. Fig. 50. Tables 30.  
ISBN 978-5-6042063-0-0

In the monograph for the first time the data concerning the digestive processes in fish according to the modern trophology are systematized. The mechanisms of digestion in fish have been critically discussed. Particular attention is paid to the role of induced autolysis and symbiotic digestion as well as their contribution in food degradation processes. Much of the monograph deals with the issues related to the influence of natural and anthropogenic factors on the activity and characteristics of digestive hydrolases. The significant attention spared the multifunctionality of digestive system and polypotentiality of digestive hydrolases as well as the previously proposed classification of physiological adaptations. The various adaptations of the digestive system (from molecular level to the biocenotic level) are described.

The monograph can be of particular interest for biologists, especially ichthyologists, hydrobiologists, physiologists, biochemists, ecologists, experts in the field of physiology of nutrition and wide circle of the readers interested in the problems of nutrition.

*The book is printed by the decision of the Academic Council of the Federal State Budgetary Institution of Science. Papanin Institute for Biology of Inland Waters. Russian Academy of Sciences (IBIW RAS) Protocol No. 9 of October 23, 2018.*

УДК 597  
ББК 28.693.32

ISBN 978-5-6042063-0-0

© Кузьмина В. В., 2018



Александр Михайлович Уголев  
(1926–1991)

## **Предисловие**

Как известно, А. М. Уголев внес значительный вклад в развитие науки о питании. Он не только описал неизвестные ранее типы пищеварения, но и предложил теорию адекватного питания. Его теоретические и экспериментальные исследования легли в основу изучения процессов пищеварения у рыб. В данной работе предпринята попытка осветить наиболее важные достижения в этой области, а также обратить внимание на некоторые спорные вопросы, касающиеся в основном механизмов пищеварения. Ранее вышли в свет монографии «Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб» (Кузьмина, 2005) и «Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации» (Кузьмина, 2015), в которых была предпринята попытка систематизации с позиций современной трофологии сведений о физиолого-биохимических основах сложного процесса экзотрофии. В этих работах значительное внимание уделялось закономерностям функционирования систем, связанных с реализацией различных этапов экзотрофии (поиск, поглощение и начальные этапы ассимиляции пищи), так и влиянию на этот процесс природных и антропогенных факторов. В отличие от ранее изданной монографии «Пищеварительные процессы и адаптации у рыб» (Уголев, Кузьмина, 1993), детально описывающей процессы мембранного пищеварения, в этих работах особое внимание обращалось на процессы симбионтного пищеварения и индуцированного аутолиза. Помимо этого значительное внимание было уделено механизмам регуляции различных звеньев процесса экзотрофии, а также адаптациям фермент-мембранных комплексов пищеварительного тракта рыб к условиям функционирования.

Вместе с тем в последние годы накопилось большое количество сведений, касающихся характеристик ферментов, функционирующих в пищеварительном тракте рыб, а также влияния антропогенных факторов на ферменты рыб и их объектов питания.

Актуальность изучения характеристик ферментов объектов питания рыб и микробиоты в значительной мере определяется тем, что их вклад в процессы пищеварения рыб может значительно снижать энергетические затраты консументов на синтез собственных ферментов. При этом некоторые из полученных в последние годы данных позволили расширить представления не только о роли гидролаз различных гидробионтов в процессах пищеварения у отдельных особей рыб, но и о не менее важной их роли в функционировании водных экосистем. Последнее в значительной мере достигается благодаря полипотентности пищеварительной системы, выполняющей трофическую, барьерную, иммунную, обменную, экскреторную, регуляторную и трансформационную функции, а также полипотентности пищеварительных гидролаз. Важно отметить, что в зарубежной литературе большое внимание уделяется мультифункциональности пищеварительного тракта рыб, которая достигается благодаря существованию специализированных структур. Вместе с тем полипотентность не требует затрат на создание новых структур. Указанные выше функции выполняют одни и те же структуры (молекулы и надмолекулярные образования). Большое место в работе занимает описание влияния на активность и характеристики ферментов приоритетных загрязнителей, в том числе магнитных полей и магнитной бури. Приведенные в монографии сведения полностью согласуются с основными постулатами теории адекватного питания и делают понятными сложившиеся в процессе эволюции трофические взаимоотношения гидробионтов в экосистемах разного типа.

В основу данной работы положены экспериментальные материалы, большая часть которых получена в лаб. экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН при доброжелательной поддержке заведующего лабораторией д.б.н., проф. Ю. В. Герасимова, которому автор всегда будет искренне признателен. Часть опытов проведена на базе Приднестровского государственного университета им. Т. Г. Шевченко благодаря поддержке д.б.н., проф. В. А. Шептицкого. Глубокая благодарность всем коллегам, участвовавшим в проведении совместных экспериментальных работ и оформлении рукописи: д.б.н. И. Л. Головановой, д.б.н. А. Н. Неваленному, к.б.н. Е. Г. Скворцовой, к.б.н. Н. В. Уша-

ковой, к.б.н. М. В. Шалыгину, к.б.н. А. А. Филиппову и особенно к.б.н. Г. В. Золотаревой, А. Ф. Тарлевой и Е. А. Куливацкой. Кроме того, автор считает своим приятным долгом поблагодарить д.б.н., чл.-кор. РАН Н. Н. Немову (Институт биологии КарНЦ РАН) и д.б.н., проф. В. Т. Комова (ИБВВ РАН) за рецензирование работы. Неизменная благодарность моим учителям профессорам Н. М. Артемову, Л. Г. Лейбсону, Э. М. Плисецкой и особенно академику А. М. Уголеву.

Часть исследований, результаты которых использованы в монографии, проведена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 06-04-48170, № 09-04-00075 и № 013-04-00248).

# **Глава 1. Механизмы пищеварения.**

## **Дискуссионные вопросы**

Вопрос о механизмах пищеварения стал актуальным после открытия А. М. Уголевым в 1958 г пристеночного пищеварения (Уголев, 1960, 1963). В настоящее время известно несколько типов пищеварения, различающихся по механизму действия ферментов на субстраты, их поступления к месту функционирования, а также по отношению процессов пищеварения к клеточным мембранам и транспортным системам. Основные типы пищеварения представлены внеклеточным дистантным (полостным), внутриклеточным (цитоплазматическим и вакуолярным), а также мембранным пищеварением (Уголев, 1972, 1985). Кроме того, важную роль в процессах пищеварения позвоночных играют индуцированный аутолиз и симбионтное (симбиотические) пищеварение (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015).

### **1.1. Структурная организация пищеварительной системы рыб**

Прежде, чем рассматривать особенности разных типов пищеварения, необходимо кратко описать структуру пищеварительного тракта рыб, который состоит из головной кишки (рот, ротовая полость, глотка) и туловищной кишки (остальная часть тракта). Пищеварительная система включает ряд специализированных областей, таких как ротовая полость и глотка, способствующих захвату, удержанию и последовательной подготовке пищи к поступлению ее во внутреннюю среду организма (Barrington, 1957; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Buddington, Kuz'mina, 2000).

*Желудок.* Поскольку процессы пищеварения начинаются в желудке, отметим, что у рыб обычно желудок хорошо развит, однако может быть редуцирован или отсутствовать. Предполагается, что утрата желудка в филогенезе носит вторичный характер и обусловлена специализацией питания, связанной с переходом на мелкие пищевые объекты. Однако его наличие или отсутствие может влиять

на интенсивность питания рыб (Сорвачев, 1982; Шпарковский, 1986). Форма желудка не всегда коррелирует с типом питания и экологией вида (Barrington, 1957). Желудок обычно включает три области (кардиальную, фундальную и пилорическую), различающиеся гистологически. Степень развития мышечного слоя и слизистой оболочки, а также расположение простых трубчатых или ветвящихся желез у разных видов рыб различна (Barrington, 1957; Bishop, Odense, 1962; Kapoor et al., 1975; Kayanja et al., 1975). Полость желудка выстлана простым, цилиндрическим эпителием, а также мукозными клетками, отличающимися по строению от истинных бокаловидных клеток. Простые или разветвленные железы открываются в углубления слизистой. Кардиальная область выстлана стратифицированным эпителием и бедна желудочными железами. Фундальная и пилорическая области у рыб с истинным желудком имеют секреторные функции и выстланы эпителием, состоящим из цилиндрических клеток, не обладающих микроворсинками, и многочисленных мукозных клеток (Bertin, 1958).

В желудочных железах костистых рыб обычно идентифицируется один тип секреторных клеток, связанных с секрецией пепсина и соляной кислоты (Barrington, 1957; Western, Jennings, 1970; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993). Однако у зимней камбалы *Pseudopleuronectes americanus* обнаружены клетки, секретирующие только соляную кислоту (Gawlicka et al., 2001). Апикальная область секреторных клеток, формирующих железы, имеет сеть канальцев, связанных с секрецией кислоты. Зимогенные гранулы, содержащие пищеварительные ферменты, расположенные в основании клеток, транспортируются к апикальной мембране и высвобождаются путем экзоцитоза (Noaillac-Dereyue, Gas, 1978). На границе желудка и кишечника гладкая мускулатура формирует своего рода пилорический сфинктер (Капоор et al., 1975; Веригина, Жолдасова, 1982).

*Кишечник.* Интенсивность процессов пищеварения в значительной степени зависит от общей поверхности кишечника, которая увеличивается за счет увеличения его длины, усложнения архитектуры слизистой, наличия пилорических придатков или спирального клапана, характерного для наиболее древних видов рыб (Barrington, 1957; Bertin, 1958; Веригина, Жолдасова, 1982). У большинства рыб длина кишечника близка длине тела, у бентофагов и макрофито-

фагов может превышать длину тела в 2–15 раз (Никольский, 1974; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982). Стенка кишечника состоит из четырех слоев: слизистого, подслизистого, мышечного и серозного. У некоторых видов рыб, в частности представителей сем. карповых, подслизистая оболочка отсутствует (Noaillac-Depeyre, Gas, 1973; Веригина, Жолдасова, 1982) Слизистая оболочка кишечника образует поперечные, косые или продольные складки, которые в зависимости от типа питания рыб могут увеличивать поверхность кишечника на порядок (Bertin, 1958; Веригина, Жолдасова, 1982). У питающихся рыб поверхность складок выстлана однослойным эпителием, состоящим на 90 % из энтероцитов.

Тонкое строение кишечного эпителия у рыб изучено достаточно подробно (Odense, Bishop, 1966; Yamamoto, 1966; Iwai, 1969; Gauthier, Landis, 1972; Noaillac-Depeyre, Gas, 1973, 1974, 1979; Kremenz, Chapman, 1975; Stroband, 1977; Ezeasor, Stokoe, 1981; Kuperman, Kuz'mina, 1994; Horn et al., 2006; Dai et al., 2007; German, 2009; Naguib et al., 2011 и др.). Апикальная поверхность энтероцитов покрыта микроворсинками, образующими щеточную кайму (Odense, Bishop, 1966; Yamamoto, 1966; Iwai, 1969, Gauthier, Landis, 1972; Noaillac-Depeyre, Gas, 1973, 1974, 1979; Kayanja et al., 1975; Kremenz, Chapman, 1975; Purkerson et al., 1975; Stroband, 1977; Frierson, Foltz, 1992; Kuperman, Kuz'mina, 1994; Корнева, Бедняков, 2011). Высота микроворсинок, образующих щеточную кайму энтероцитов, у разных видов рыб, как правило, варьирует в пределах ~ 1-2 мкм. Кроме того, наблюдаются различия высоты микроворсинок в разных участках кишечника у рыб одного вида (Уголев, Кузьмина, 1993). Так, у шиповатого ската *Raja clavata* высота микроворсинок энтероцитов в медиальной части «спирального» кишечника достоверно выше, чем в дистальной –  $1.16 \pm 0.07$  и  $0.72 \pm 0.12$  мкм (Кузьмина и др., в печати). У голодающих рыб может наблюдаться ложная многорядность (Васильева, Коровина, 1968; Васильева, 1970; Суворова, Трещук, 1973) и почти двукратное уменьшение длины микроворсинок (Iwai, 1969).

Энтероциты связаны между собой системой плотных контактов и десмосом, обеспечивающих взаимодействие, но не предотвращающих движение воды, одновалентных ионов и даже некоторых крупных молекул. При исследовании катрана *Squalus acanthias* обнаружены электронно-плотные «тяжи», лежащие поперек энтероци-

тов и содержащие липидные капли, которые отходят от десмосом. По всей вероятности, они способствуют более быстрому проникновению нутриентов, поступающих через межклеточные пространства, внутрь клеток (Кузьмина и др., в печати). Было высказано предположение, что наличие контактов различного типа обусловлено физиологическим состоянием рыб (Kuperman, Kuz'mina, 1994).

В цитоплазме энтероцитов присутствуют терминальная сеть, везикулы, ядро, комплекс Гольджи, лизосомы, микротрубочки и свободные рибосомы и гранулярная эндоплазматическая сеть (Noaillac-Depeyre, Gas, 1979; Stroband, 1977; Kuperman, Kuz'mina, 1994; Кузьмина, 2005). Ниже представлены фрагменты ультраструктуры энтероцитов у налима *Lota lota* (рис. 1.1).

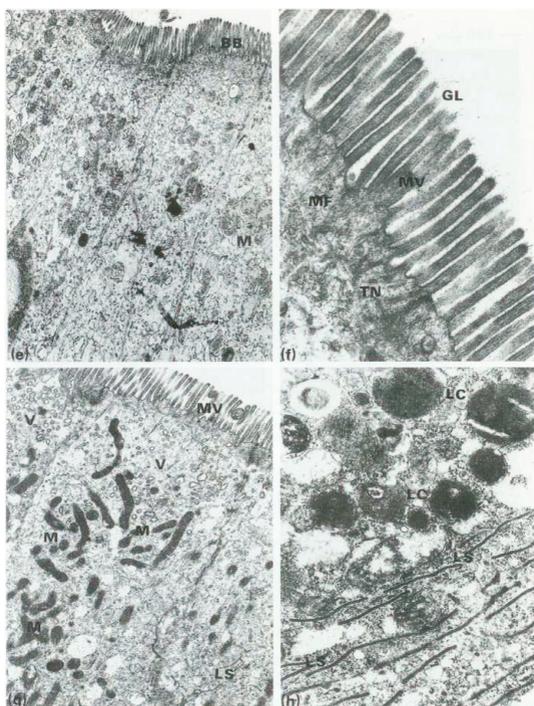


Рис. 1.1. Ультраструктура различных частей энтероцитов у налима (Kuperman, Kuz'mina, 1994)

Обозначения: BB – щеточная кайма, GL – гликокаликс, LC – лизосомальный комплекс, LS – ламинарные структуры, M – митохондрии, MF – микрофиламенты, MV – микроворсинки, TN – терминальная сеть, V – везикулы.

На рисунке хорошо видны границы энтероцитов, щеточная кайма, отдельные микроворсинки на апикальной поверхности энтероцитов, митохондрии, лизосомы и другие органеллы. Помимо энтероцитов слизистая оболочка содержит бокаловидные клетки, заполненные секреторными гранулами. Образованная ими слизь формирует слой слизистых наложений. Также в эпителии присутствуют грушевидные клетки, ассоциированные иммунные клетки, в частности фагоцитарные клетки и лимфоциты. Многоклеточные железы в слизистой оболочке кишечника рыб отсутствуют, но встречаются клетки, содержащие гранулы и обладающие секреторными функциями (Bertin, 1958; Kroog et al., 1975; Веригина, Жолдасова, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005).

*Поджелудочная железа.* Поджелудочная железа выполняет экзокринные и эндокринные функции. У некоторых видов рыб поджелудочная железа – компактный орган, у большинства – диффузный (Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982; Buddington, Kuz'mina, 2000; Кузьмина, 2005). Ткань, содержащая экзокринные клетки, может простираться вдоль печеночной портальной вены и кровеносных сосудов, расположенных рядом с кишечником (Kurokawa, Suzuki, 1995), а также присутствовать в висцеральном мезентерии и кишечнике (Yamane, 1973 a,b). Последнее затрудняет решение вопроса о происхождении некоторых ферментов, функционирующих в слизистой оболочке кишечника (Barrington, 1957). У многих видов рыб ткани поджелудочной железы включены в состав печени и образуют гепатопанкреас, изредка присутствуют в селезенке (Веригина, Жолдасова, 1982). Сок поджелудочной железы, содержащий ферменты, через протоки поступает в проксимальный отдел кишечника и пилорические придатки (Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982; Buddington, Kuz'mina, 2000).

## **1.2. Внеклеточное или полостное пищеварение**

Полостное пищеварение было описано в конце XVIII в., когда в экспериментах на разных животных, в том числе на рыбах, было показано, что желудочный сок может разлагать ткани животных (Spallanzani, 1783). Внеклеточное пищеварение происходит в специальных полостях далеко от секреторных клеток и обознача-

ется как дистантное, или полостное (Коштоянц, 1950; Павлов, 1951; Buddenbrock, 1956; Бабкин, 1960; Уголев, 1961, 1963, 1967, 1972, 1985; Jennings, 1972 и другие). Благодаря полостному пищеварению происходят начальные стадии гидролиза биополимеров, которые реализуются ферментами, секретлируемыми различными железами и действующими в полостях пищеварительного тракта. Так как ферменты, выделяемые вместе с пищеварительными соками, функционируют в водной фазе, их распределение произвольно, а ориентация их активных центров по отношению к субстратам, носит вероятностный характер. Вследствие этого полостное пищеварение высоко эффективно в отношении гидролиза макромолекул и неэффективно в отношении гидролиза олиго- и димеров, а также передачи продуктов гидролиза к транспортным системам (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993). Многочисленные данные, касающиеся закономерностей полостного пищеварения, приводятся в ряде обзоров (Коштоянц, 1950; Павлов, 1951; Buddenbrock, 1956; Barrington, 1957; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Кузьмина, 2005, 2008, 2015; Kuz'mina, 2008, 2017; Кузьмина и др., 2016).

В желудке под действием аспаргатных пептидаз в кислой среде преимущественно разрушаются белки. Основным ферментом, участвующим в деградации белков, является пепсин (Merret et al., 1969, Fange, Grove, 1979; Guerard, Le Gal, 1987; Gildberg et al., 1990; Gawlicka et al., 2001). Поскольку значения pH желудочного сока у разных видов рыб изменяются от 1.6 до щелочных значений (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 2008). Возможен гидролиз и других пищевых субстратов, в частности липидов и углеводов. Действительно, в желудке может быть обнаружена активность липазы и амилазы (Barrington, 1957; Kuz'mina, Golovanova, 2004), которые, скорее всего, благодаря регургитации поступают из кишечника.

В кишечнике наблюдается последующее разрушение белков, а также гидролиз углеводов и липидов. На протяжении большей части кишечника pH соответствует нейтральным или щелочным значениям. Однако у ихтиофагов, обладающих желудком с ярко выраженной кислотообразующей функцией, pH энтеральной среды в краниальном участке кишечника может иметь кислые значения pH. Ферменты (трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза А и В,

эластаза,  $\alpha$ -амилаза, липаза), реализующие полостное переваривание белков (Cohen et al., 1981; Hofer, Schiemer, 1981; Raae, Walther, 1989; Srivastava et al. 2003), углеводы (Кузьмина, 1984) и липиды (Brockhoff, Hoyle, 1965; Leger, Bauchart, 1972; Lie, Lambertsen, 1985) синтезируются в поджелудочной железе и затем секретируются в кишечную полость. В результате действия этих ферментов в основном образуются олигомеры (Уголев, Кузьмина, 1993 а).

При этом в содержимом желудка и кишечника присутствуют не только ферменты консументов, но и многочисленные ферменты жертв, а также ферменты, синтезированные энтеральной микробиотой и другими симбионтами. После описания механизмов симбионтного пищеварения и индуцированного аутолиза стало ясно, что в настоящее время работы, корректно оценивающие роль этого механизма в системе пищеварительных процессов у рыб из природных экосистем, практически отсутствуют (Кузьмина, 2005, 2008, 2015).

### 1.3. Внутриклеточное пищеварение

Внутриклеточное пищеварение описано Мечниковым (1880) при изучении морских беспозвоночных. В настоящее время различают два типа внутриклеточного пищеварения. Первый тип реализуется за счет переноса малых молекул через мембраны энтероцитов и последующего их гидролиза ферментами цитозоля. Второй тип связан с макромолекулярным транспортом белков и пептидов через мембраны энтероцитов путем эндоцитоза (фагоцитоза или пиноцитоза), образованием специализированных вакуолей и их слиянием с лизосомами (Уголев, Кузьмина, 1993, Kuz'mina, 2008). При этом разрушение пищевого субстрата происходит в фаголизосомах при участии лизосомальных ферментов, функционирующих при низких значениях pH (De Duve, 1963; Высоцкая, Немова, 2008). Эндоцитоз играет важную роль на всех стадиях онтогенеза рыб (Govoni et al., 1986; Кузьмина, Гельман, 1998; Kuz'mina, 2008). Об этом свидетельствует значительное количество инвагинаций апикальной мембраны, наличие многочисленных везикул и лизосом в энтероцитах, локализованных в дистальных отделах кишечника (Gauthier, Landis, 1972, Noaillac-Depeyre, Gas, 1979, Ezeasor, Stokoe, 1981, Kuperman, Kuz'mina, 1994).

Для процессов внутриклеточного пищеварения особенно важны лизосомы, ферменты которых могут разрушать абсолютное большинство пищевых субстратов. При исследовании слизистой оболочки кишечника у высших животных выявлено наличие кислых гидролаз: кислой фосфатазы,  $\beta$ -галактозидазы, кислой рибонуклеазы и других (Уголев, 1985). Особую роль играют протеолитические ферменты лизосом, такие как катепсины, способные гидролизовать белки до уровня аминокислот (Высоцкая, Немова, 2008). Активность пептидаз в лизосомах значительно выше, чем в цитозоле. Однако до 90 % дипептидов может гидролизоваться цитозольными дипептидазами энтероцитов (Уголев, Кузьмина, 1993). При этом у некоторых видов рыб активность лейциналаниндипептидазы цитозоля обычно выше в период начала экзогенного питания, но имеет тенденцию к уменьшению по мере развития личинок (Cahu, Zambonino-Infante, 2001; Kolkovski, 2001, Kvåle et al., 2007). Было высказано предположение, что изменение активности пептидаз цитозоля в онтогенезе отражает изменения в способе переваривания личинками пищи, которое становится в большей степени связанным с полостным, чем с внутриклеточным пищеварением (Cahu, Zambonino-Infante, 2001).

## 1.4. Мембранное пищеварение

Как указывалось выше, в 1958 г. был открыт и позднее подробно описан неизвестный ранее тип пищеварения (пристеночное, или контактное пищеварение), которое впоследствии из-за трудностей перевода стало называться мембранным пищеварением (Уголев, 1960, 1961, 1963, 1967, 1972, 1985, 1991). После того, как была доказана возможность гидролиза пищевых субстратов в слизистом слое, покрывающем люминальную поверхность слизистой (Морозов и др., 1988), часть отечественных авторов вернулась к первоначальному названию этого процесса. По мнению этих авторов, слизь бокаловидных клеток, распределяющаяся в пристеночном слое и представляющая собой гликопротеидный гель, обладающий высокой сорбционной способностью, позволяет ей участвовать в процессах пищеварения. С учетом этих представлений Г. Ф. Коротько процессам, происходящим в зоне слизистой оболочки, вернул первоначальное название – пристеночное, или контактное пищеваре-

ние, а мембранным пищеварением называет лишь процессы, происходящие на мембранах энтероцитов (Коротько, 2005). При этом важно подчеркнуть, что А. М. Уголев изначально открытый им механизм рассматривал не только, как гидролиз пищевых субстратов на мембранах энтероцитов (Уголев, 1960, 1963). Особенно это стало ясно после описания гликокаликса (Granger, Baker, 1950) и его роли в процессах мембранного пищеварения (Уголев, 1972).

Вскоре после открытия пристеночного, или мембранного пищеварения было установлено, что оно реализуется ферментами, абсорбированными из полости, и собственно кишечными ферментами. Все ферменты локализуются на поверхности клеточных мембран. У позвоночных это происходит на апикальной поверхности мембраны энтероцитов (Уголев, 1972, 1985). Как было отмечено выше, апикальная поверхность мембраны энтероцитов образует щеточную кайму, состоящую из многочисленных пальцеобразных выростов плазматической мембраны – микроворсинок.

Наличие процессов мембранного пищеварения у рыб было продемонстрировано в 60-70-е годы (Берман, Салиенице, 1966; Пегель и др., 1971; Уголев, 1972; Кузьмина 1976, 1977). Мембранное пищеварение реализуется ферментами, синтезируемыми поджелудочной железой и адсорбируемыми на структурах щеточной каймы энтероцитов, а также собственно кишечными ферментами (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993).

Высота микроворсинок в разных частях кишечника рыб может быть различной (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuperman, Kuz'mina, 1994). Это характерно не только для типичных планкто-, бенто- и ихтиофагов, но и для рыб со специфическим спектром питания. Интересны результаты изучения особенностей желудочно-кишечного тракта у 4-х видов рыб, относящихся к сем. Loricaridae (*Panaque cf. nigrolineatus*, *P. nocturnus*, *Hypostomus pyrineusi* и *Pterygoplichthys disjunctivus*), потребляющих бентос и древесину. Авторами обнаружено, что в кишечнике всех видов наблюдается не только снижение высоты складок, но и уменьшение длины и плотности распределения микроворсинок в дистальном направлении (German, Bittong, 2009).

Для процессов мембранного пищеварения важны обнаруженные на поверхности микроворсинок образующие сеть фибриллы – гликокаликс (Odense, Bishop, 1966; Noaillac-Depeyre, Gas, 1974;

Курегман, Кузьмина, 1994). Толщина гликокаликса составляет от 100 до 500 нм (Уголев, Кузьмина, 1993). Гликокаликс образуют гликопротеиды, углеводными компонентами которых являются глюкозамины или слабосульфатированные мукополисахариды и гликолипиды. Мукополисахаридные нити связаны между собой кальциевыми мостиками, которые периодически разрушаются, способствуя прохождению крупных молекул вглубь гликокаликса (Комиссарчик, Уголев, 1970). Эта структура быстро разрушается, поэтому выявляется лишь в немногих работах. Сопоставление структуры щеточной каймы у исследованных в одинаковых условиях щуки *Esox lucius* и налима *Lota lota*, показывает, что гликокаликс ярко выражен лишь у последнего вида (рис. 1.2).

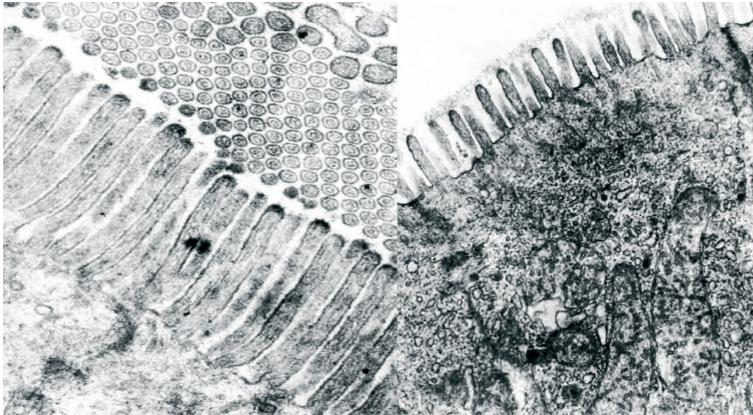


Рис. 1.2. Ультраструктура апикальной части энтероцитов щуки (слева) и налима (справа) (Курегман, Кузьмина, 1994)

Ферменты, реализующие мембранное пищеварение имеют различное происхождение: 1) адсорбированные из кишечной полости, в основном панкреатические ферменты; 2) собственные ферменты кишечной мембраны, синтезированные энтероцитами и включенные в их апикальную мембрану. Первые являются эндогидролазами, участвующими в основном в промежуточных стадиях гидролиза биополимеров, в то время как последние, являющиеся в основном экзогидролазами, реализуют заключительные стадии их гидролиза. Первые локализуются на разных уровнях гликокаликса, последние

имеют различную локализацию на структурах трехслойной фосфолипидной мембраны (периферическую или трансмембранную).

При исследовании млекопитающих показано, что такие ферменты, как щелочная фосфатаза, аминопептидаза,  $\gamma$ -амилаза, мальтаза и другие, локализованные на липопротеиновой мембране, являются амфипатическими и состоят из гидрофильных и гидрофобных частей (Louvard et al., 1975 a, b, 1976; Уголов, 1985, Egorova, Ugolev, 1989). Гидрофобный домен, состоящий в основном из гидрофобных аминокислот, проникает через мембрану и в ряде случаев заканчивается небольшим гидрофильным пептидом, расположенным на внутренней поверхности мембраны. Этот домен выполняет якорные, регуляторные и, возможно, другие функции (Egorova, Ugolev, 1989). Гидрофильная часть фермента обладает активными сайтами и, следовательно, ферментативно активна. При этом основная масса молекулы может выступать над поверхностью мембраны энтероцитов. В частности, сахаразо-изомальтазный комплекс выступает над поверхностью мембраны энтероцитов на 15 нм (Nishi, Takesue, 1978). Мембранные гидролазы имеют частичную ориентацию активных сайтов по отношению к субстратам. Структура щеточной каймы делает возможной последовательную деградацию питательных веществ по мере прохождения продуктов гидролиза через гликокаликсное пространство (Ugolev, 1989; Kuz'mina, 2008).

Наличие процессов мембранного пищеварения у рыб было продемонстрировано в 60–70-е годы XX века (Берман, Саленице, 1966; Пегель и др., 1971; Уголев, 1972; Кузьмина 1976, 1977). У рыб, как и у других позвоночных, мембранное пищеварение реализуется ферментами, синтезируемыми поджелудочной железой и адсорбируемыми на структурах щеточной каймы энтероцитов, а также собственно кишечными ферментами (Уголев, Кузьмина, 1993). Мембранный гидролиз нутриентов реализуют как адсорбированные ферменты: пептидазы (Munilla-Moran, Sabarido-Rey, 1996 a; Ribeiro et al., 2002), карбоксипептидаза А и В (Srivastava et al., 2003),  $\alpha$ -амилаза (Кузьмина, 1977, 1979, 1984, Munilla-Moran, Sabarido-Rey, 1996 b, Ribeiro et al., 2002), липаза (Swarup, Goel, 1975), так и собственно кишечные ферменты: аминопептидазы (Plantikow, Plantikow, 1985; Cahu et al., 1998), дипептидазы (Ash, 1980; Ribeiro et al., 2002), мальтаза (Кузьмина, 1984; Buddington, Hilton, 1987;

Ugolev, Kuz'mina, 1994), щелочная фосфатаза (Ikeda, 1959, Prakash, 1961, Gelman et al., 1992; Cahu et al., 1998; Ribeiro et al., 2002).

Вместе с тем, как отмечалось ранее: 1. Работ, касающихся исследования закономерностей процессов мембранного пищеварения, крайне мало. 2. Работ, касающихся характеристик ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения и выполненных в корректных условиях (удаление слоя слизистых наложений и ферментов, не связанных со структурами гликокаликса, которые десорбируются в течение 30 сек) также мало. 3. Работ, касающихся характеристик ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения, но выполненных без соблюдения условий, указанных в п. 2., исключительно много, поскольку в абсолютном большинстве работ исследуется ферменты слизистой оболочки кишечника рыб. Это обстоятельство позволяет считать, что в настоящее время характеристики ферментных систем, обеспечивающих этот тип пищеварения, изучены значительно подробнее, чем характеристики ферментов, обеспечивающих другие типы пищеварения. В этом случае предлагалось указанный механизм обозначать не термином мембранное пищеварение, а термином, изначально предложенным А. М. Уголевым (1960, 1963) – контактное или пристеночное пищеварение (Кузьмина 2005).

Важно отметить, что у рыб разных по таксономии выявлены существенные различия в локализации, прочности фиксации, а также в уровне активности адсорбированных и собственно кишечных мембранных ферментов (Пегель и др., 1971; Кузьмина, 1976, 1977). При изучении локализации ферментов в полости и на структурах щеточной каймы энтероцитов было доказано, что у рыб существуют радиальные градиенты активности ферментов. В частности, уровень активности  $\alpha$ -амилазы в полости выше, чем в слизистой оболочке, активности мальтазы и щелочной фосфатазы, связана преимущественно со слизистой оболочкой кишечника, сахараза связана исключительно со слизистой оболочкой кишечника (Уголев, Кузьмина, 1993). При использовании метода реплик было показано, что у леща *Abramis brama* около 30 % активности  $\alpha$ -амилазы и мальтазы, а также около 10 % активности щелочной фосфатазы концентрируется в гликокаликсе, в то время как сахараза связана исключительно с поверхностью микроворсинок (рис. 1.3).

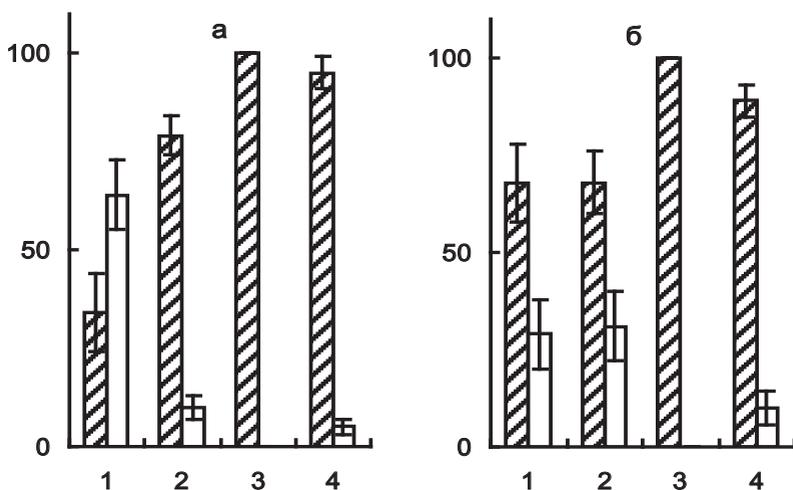


Рис. 1.3. Соотношение активности некоторых ферментов в слизистой оболочке и в полости кишечника (а), в слизистой оболочке и в апикальном гликокаликсе (б) у леща (по: Кузьмина, 1992).

*Обозначения:* по горизонтали ферменты: 1 – α-амилаза, 2 – мальтаза, 3 – сахараза, 4 – щелочная фосфатаза. По вертикали активность ферментов, % суммарной активности препарата. Темные столбики – слизистая оболочка кишечника, светлые столбики – полость кишечника (а) или апикальный гликокаликс (б).

Исследование адсорбционных свойств гликокаликса позволило высказать предположение о том, что существует градиент адсорбции ферментов. Было выделено три фракции: 1) поверхностная фракция на границе гликокаликса и химуса; 2) внутригликокаликсная фракция; 3) фракция, связанная с 3-слойной мембраной энтероцитов. Также было показано, что адсорбция влияет на свойства ферментов и что функции последних могут зависеть от их локализации (Уголев, 1972).

Вместе с тем важно отметить, что при изучении гомогенатов слизистых оболочек, помимо активности щеточнокоемных ферментов, обнаруживается активность гидролаз, локализованных в субэпителиальных слоях слизистой оболочки кишечника рыб. Так, при изучении активности глицил-L-лейцилдипептидазы и щелочной фосфатазы у леща соответствующие активности были обнаружены не только в строме, но и в мышечно-серозном слое (таблица 1.1).

Таблица 1.1.

**Уровень активности ферментов в различных слоях стенки кишечника  
леща, мкмоль / (г•мин) (по: Уголев, Кузьмина, 1992)**

Ферменты	Ферментативная активность рН, 7.4		
	Эпителий	Строма	Мышечно-серозный слой
Сахараза	$0.73 \pm 0.16$ $6.1 \pm 1.33$	$0$ $0$	$0$ $0$
Глицил-L-лейцилдипептидаза	$10.3 \pm 1.89$ $85.5 \pm 15.6$	$4.7 \pm 1.5$ (45.6) $34.6 \pm 11.2$ (40.5)	$7.1 \pm 0.9$ (68.9) $42.7 \pm 5.6$ (49.9)
Щелочная фосфатаза, рН 9.9	$4.63 \pm 0.90$ $38.6 \pm 7.5$	$1.27 \pm 0.22$ (27.4) $9.3 \pm 1.6$ (24.1)	$0.51 \pm 0.02$ (11.0) $3.1 \pm 0.1$ (8.0)

*Примечание:* числа над линией – активность ферментов в расчете на 1 г ткани; числа под линией – активность ферментов в расчете на 1 г белка. Числа в скобках – относительная активность ферментов, % от активности соответствующего фермента в эпителии.

Исследование более широкого спектра ферментов подтвердило относительно высокий уровень активности протеаз и гликозидаз в мышечно-серозном слое (табл. 1.2).

Таблица 1.2.

**Соотношение активности ферментов в слизистой оболочке  
и мышечно-серозном слое у леща, мкмоль / (г • мин)  
(по: Уголев, Кузьмина, 1992)**

Ферменты	Ферментативная активность рН, 7.4	
	Слизистая (эпителий + строма)	Мышечно-серозный слой
Сахараза	$0.63 \pm 0.07$ $4.9 \pm 0.6$	$0$ $0$
Общая амилолитическая активность	$5.9 \pm 0.4$ $38.3 \pm 2.6$	$3.9 \pm 0.2$ (66.1) $30.5 \pm 1.6$ (79.6)
Общая протеолитическая активность	$5.6 \pm 0.9$ $36.4 \pm 5.8$	$1.1 \pm 0.4$ (19.6) $8.6 \pm 3.1$ (23.6)
Глицил-L-глициндипептидаза	$1.1 \pm 0.2$ $7.1 \pm 1.3$	$2.2 \pm 0.4$ (200.0) $17.2 \pm 3.1$ (242.3)
Глицил -L-валиндипептидаза	$2.0 \pm 0.3$ $13.0 \pm 2.3$	$1.5 \pm 0.3$ (75.0) $11.7 \pm 2.0$ (90.0)

*Примечания,* как в табл. 1.1.

Эти данные позволили пересмотреть отношение к некоторым данным, полученным при изучении гомогенатов. Действительно, кровеносные сосуды постэпителиальных слоев содержат панкреатические ферменты (Коротько, 2005), причем уровень активности одноименных ферментов в крови рыб разных видов различен (Кузьмина, 1979). В миоцитах функционируют лизосомальные ферменты, гидролизующие те же связи, что и мембранные ферменты (Покровский, Тутельян, 1976; Немова, 1996; Лысенко и др., 2011). Вследствие этого, несмотря на сходство происхождения и свойств ряда ферментов, в частности гидролаз, синтезируемых поджелудочной железой, данные, полученные при изучении гомогенатов, не отражают реальную активность ферментов, реализующих мембранное пищеварение.

В связи с этим для характеристики мембранного пищеварения использовались различные приемы. В частности, был проведен большой цикл экспериментов по динамике десорбции ферментов с отрезков кишки (Кузьмина, 1976, 1977). Это связано с тем, что по данным о кинетике десорбции гидролаз панкреатического происхождения можно судить о градиенте их адсорбции на структурах щеточной каймы энтероцитов. В этих целях у ряда видов пресноводных костистых рыб, различающихся по систематике и экологии, была исследована кинетика десорбции  $\alpha$ -амилазы с отрезков кишечника (Кузьмина, 1977). Чтобы исключить влияние десквамации энтероцитов на динамику десорбции  $\alpha$ -амилазы, в качестве контроля за количеством клеточного материала в соответствующих фракциях определяли количество нуклеиновых кислот (рис. 1.4).

Результаты этих экспериментов показали, что, независимо от типа питания рыб, наименьшее количество нуклеиновых кислот содержится в элюатах, а наибольшее в фракции гомогената:

у налима –  $92.6 \pm 1.1$

у карпа –  $90.0 \pm 1.7$

у окуня –  $85.36 \pm 4.3$ ,

у леща –  $78.0 \pm 1.5$  %.

Следовательно, наибольшее количество энтероцитов содержится в фракции гомогената, а наблюдаемые различия обусловлены именно различиями в десорбции  $\alpha$ -амилазы у рыб разных экологических групп.

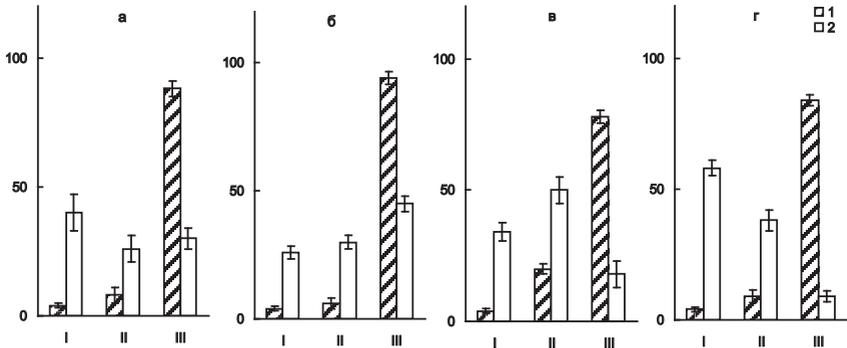


Рис. 1.4. Соотношение активности  $\alpha$ -амилазы (1) и количества нуклеиновых кислот (2) в трех основных фракциях: смыва (I), десорбируемого фермента (II) и гомогената (III) в медиальном отделе кишечника рыб, % от суммарной активности  $\alpha$ -амилазы и количества нуклеиновых кислот (по: Уголев, Кузьмина, 1993)

Обозначения: а – окунь, б – налим, в – лещ, г – карп.

Полученные данные свидетельствовали о том, что время, требующееся для полной десорбции  $\alpha$ -амилазы с отрезка кишки, у разных видов рыб в идентичных методических условиях различно. У типичных ихтиофагов (щука) ферменты десорбируются со слизистой за 15–20 мин, у ихтиофагов-факультативных бентофагов (налим, окунь) – за 40 мин, у планкто- и бентофагов полная десорбция, как правило, требует 120–150 мин. Несмотря на различную активность фермента у рыб разных видов, прослеживается одна общая закономерность: фракция адсорбированной на поверхности кишки амилазы у «мирных» рыб по активности превышает фракцию смываемой амилазы и особенно фракцию гомогената. У хищных рыб, напротив, фракция гомогената по активности выше таковой десорбируемой амилазы. Вычисление отношения активности десорбируемой амилазы к не десорбируемой – фракции гомогената (Д/Г) показало, что для «мирных» рыб значения  $Д/Г > 1$ , для хищных –  $< 1$ . Так, у налима отношение  $Д/Г$  соответствует 0.4, у щуки – 0.6, у окуня – 0.3, во время как у леща – 7.2, у карпа – 9.5. Описанная закономерность характерна для всех отделов пищеварительного тракта исследованных рыб. Активность гомогенатов слизистой у налима во всех отделах кишки одинакова и составляет 50 % от общей активности, у щуки и окуня – около 40–50 %, у «мирных» рыб – около

10 %. Выявленная закономерность, несмотря на сезонные различия в уровне ферментативной активности, прослеживается на протяжении всего годового цикла рыб (Кузьмина, 1977).

Приведенные результаты согласуются с данными, свидетельствующими о различиях в десорбции  $\alpha$ -амилазы у разных видов млекопитающих (Уголев, 1963, 1972), а также о более низкой амилитической активности ферментов, десорбированных с поверхности слизистой оболочки при перфузии у хищных рыб по сравнению «мирными» рыбами (Пегель, Реморов, 1967). Эти факты позволили высказать предположение, что разный градиент десорбции (адсорбции)  $\alpha$ -амилазы у рыб, различающихся по характеру питания, обусловлен различиями в структуре щеточной каймы энтероцитов и различиями в сорбционных свойствах слизистой оболочки, в том числе ограниченной способности слизистой оболочки к хемосорбции (Кузьмина, 1977).

В заключение важно отметить, что количество работ, касающихся исследования закономерностей и особенностей процессов мембранного пищеварения, выполненных в корректных условиях, невелико. Более того, оказывается, что большинство данных, полученных при исследовании активности ферментов в гомогенатах слизистой оболочки кишечника, далеко не всегда отражают активность ферментов, участвующих в процессах пищеварения. Действительно, согласно данным, представленным в табл. 1.2, активность глицил-L-лейциндипептидазы в эпителии составляет лишь 46.6 %, щелочной фосфатазы – 72.2 % от суммарной активности гомогената.

Если исследуется слизистая, включающая помимо эпителия строму, то эти значения, как правило, увеличиваются (1.1 и 1.2). При этом активность щелочной фосфатазы в эпителии и строме составляет 92 % от суммарной активности гомогената, а активность дипептидаз значительно ниже таковой щелочной фосфатазы. Уровень общей амилитической активности в эпителии и строме составляет 60 %, общей протеолитической активности 84 %. Сопоставление данных, представленных в этих таблицах, свидетельствует о том, что в разных опытах у рыб одного и того же вида соотношение активности одного и того же фермента (глицил-L-лейциндипептидаза) может быть различным. Следовательно, корректно можно оценивать лишь активность сахаразы, представленной только в эпителии, и, возможно, неко-

торых других, ранее не исследованных ферментов, а также щелочной фосфатазы. Вместе с тем данные, касающиеся характеристик панкреатических по происхождению ферментов в значительной мере близки характеристикам десорбированных со слизистой ферментов.

Таким образом, для оценки активности гидролаз, реализующих мембранное пищеварение, наиболее корректно исследование ферментов, функционирующих в перфузатах (Пегель, Реморов, 1967), ферментов, десорбированных с поверхности слизистой оболочки кишечника (Кузьмина, 1976), а также ферментов, функционирующих в составе везикул (Stane et al., 1979) или глицериновых моделей энтероцитов (Уголев и др., 1979). Роль ферментов постэпителиальных слоев в процессах пищеварения рыб и других животных в настоящее время оценивать сложно. Однако не исключено, что получение дополнительных сведений позволит деполимеризацию веществ, аналогичных нутриентам пищеварительного тракта, рассматривать, как «постэпителиальное» пищеварение.

## 1.5. Симбионтное пищеварение

Важная роль процессов симбионтного (симбиотического) пищеварения в системе пищеварительных процессов была обоснована в работах Уголева (1985, 1991). Описанию закономерностей симбионтного пищеварения предшествовало накопление в течение последних десятилетий XX в. многочисленных фактов, свидетельствующих о важной роли микробиоты кишечника в гидролизе и трансформации пищевых субстратов. Было установлено, что бактерии разрушают не только легко гидролизующиеся пищевые субстраты, но и такие компоненты пищи, как лигнин, пектин, целлюлоза, хитин и другие, не поддающихся гидролизу ферментными системами позвоночных, в том числе рыб (Чахава, 1972; Уголев, 1985, 1991; Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Уголев Кузьмина, 1993; Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2005, 2015).

Как известно, в момент рождения пищеварительный тракт рыб в течение короткого периода времени свободен от бактерий (Шивокене, 1989; Cahill, 1990; Lubianskienė, Jastiuginiene, 1996; Buddington et al., 1997). Значительная часть бактерий поступает в организм рыб с водой и пищей в самый начальный период экзогенного

питания (Buddington et al., 1997; Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2005, 2015; Romero, Navarrete, 2006). Микробиота кишечника рыб в зависимости от потребности в кислороде делится на аэробную, факультативно анаэробную и анаэробную (Шивокене, 1989). Аэробная микробиота в кишечнике рыб, как правило, подобна таковой объектов питания рыб.

*Состав микрофлоры кишечника рыб.* У рыб широко представлены виды р.р. *Pseudomonas* (Зубкова, 1965, Лубянскене, Янкевичюс, 1975; Mickeniene, Šyvokiene, 1996; Buddington et al., 1997) *Enterobacter* (Trust, Sparrow, 1974), *Aeromonas* (Trust, Sparrow, 1974; Лубянскене, Янкевичюс, 1975; Mickeniene, Šyvokienė, 1996) и *Acinetobacter* (Trust, Sparrow, 1974). У некоторых видов рыб найдены представители р.р. *Bacillus* (Зубкова, 1966), *Proteus* (Зубкова, 1966), *Achromobacter* (Зубкова, 1966, Лубянскене, Янкевичюс, 1975), *Flavobacterium* (Buddington et al., 1997; Šyvokienė et al., 1997), но доминируют виды, входящие в р.р. *Micrococcus* и *Bacterium* (Лубянскене, Янкевичюс, 1975).

Облигатная анаэробная микрофлора в кишечнике большинства пресноводных рыб встречается реже, чем аэробная. В пищеварительном тракте некоторых рыб выявлены микроорганизмы р.р. *Clostridium*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* и *Peptostreptococcus* (Зубкова, 1965; Trust, Sparrow, 1974; Trust et al., 1979; Clements, 1997). Микроорганизмы р. *Vibrio* в кишечнике пресноводных рыб встречаются редко. В пищеварительном тракте морских рыб преобладают микроорганизмы р.р. *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corinebacterium*, *Flavobacterium* и *Micrococcus* (Horsley, 1977; Cahill, 1990; Olafsen, 2001). Из слизистой оболочки кишечника некоторых видов рыб были выделены молочнокислые бактерии, принадлежащие к р. *Lactobacillus* (Olafsen, 2001).

Несмотря на то, что пища считается основным экзогенным фактором, влияющим на микробиоту кишечника, при изучении личинок трески *Gadus morhua* было установлено, что живой корм не является основным определяющим фактором (Bakke et al., 2011). Сравнение структуры полостных и связанных с слизистой оболочкой рыб бактерий позволило выявить наличие аутохтонной микробиоты. Бактериальное сообщество, ассоциированное со слизистой оболочкой кишечника довольно стабильно. Состав люминального сообщества

изменяется в зависимости от такового в воде и пище (Ogbondeminu, 1993; Buddington et al., 1997; Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012)

Качественное и количественное соотношение микроорганизмов в содержимом кишечника в значительной мере зависит от интенсивности питания и состава пищи рыб. У бореальных видов наибольшее количество микроорганизмов выявлено летом (Trust et al., 1979; Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Šyvokienė et al., 1996; Kuz'mina, 2008). В кишечнике бореальных видов рыб зимой и в периоды голодания количество видов и уменьшается (Лубянскене и др., 1989). Композиция пищи также влияет на количество физиологических групп бактерий: гетеротрофные и протеолитические бактерии присутствуют практически у всех видов рыб, амилитические встречаются только в том случае, если в рационе рыб содержится растительная пища (Šyvokienė et al., 1996). Кроме того, на энтеральную микробиоту влияет изменение температуры (Sugita et al., 1989; MacMillan, Santucci, 1990) и солености (Sugita et al., 1982; Hamid et al., 1979).

*Ферменты энтеральной микробиоты, аналогичные ферментам рыб.* Процессы деградации пищевых продуктов реализуются ферментами аэробной и анаэробной микрофлоры (Ringo, Birkbeck, 1999; Austin, 2002, 2006; Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012; Li et al., 2014). Изучение бактерий, выделенных из слизистой оболочки кишечника, позволило выявить ряд гидролаз, аналогичных ферментам, синтезируемым пищеварительной системой рыб: пептидаз, гликозидаз, липаз, фосфатаз и других (Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012; Кузьмина, 2015). Помимо этого многие штаммы микроорганизмов синтезируют гидролазы, участвующие в деградации хитина, целлюлозы, целлюбиозы, ксилозы и других компонентов пищи. Почти у всех исследованных видов рыб присутствуют протеолитические бактерии. Активность внеклеточных пептидаз, главным образом, металлоэндопептидаз, обнаружена у бактерий, принадлежащих к р.р. *Pseudomonas* (Hamid et al, 1979; Belchior, Vacca, 2006), *Aeromonas* (Hamid et al, 1979; Trust et al, 1979), *Bacillus* (Skrodenytė - Arbačiauskienė, 2000; Ghosh et al, 2002; Esakkiraj et al, 2009; Askarian et al, 2012), *Vibrio* (Hamid et al., 1979; Gatesoupe, 1997), *Acinetobacter* (Hamid et al., 1979; Askarian et al, 2012), *Aeromonas* (Hamid et al., 1979; Trust et al., 1979) и *Enterobacter* (Hamid et al., 1979; Gatesoupe, 1997). Протеолитическая активность обнаружена при исследовании микро-

биоты кишечника у целого ряда видов рыб из Рыбинского и Кучурганского водохранилищ (Кузьмина, 2005, 2015; Kuz'mina et al., 2011, 2017; Кузьмина и др., 2016).

Количество бактерий, разрушающих белки и углеводы, у разных видов рыб варьирует в течение годового цикла рыб (табл. 1.3).

Таблица 1.3.

**Численность протеолитических (П) и амилолитических (А) бактерий в кишечнике рыб в разные сезоны, число клеток/мл (по: Voveriene, 2002)**

Виды	Зима		Лето	
	П	А	П	А
Корюшка <i>Osmerus eperlanus</i>	$1.1 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^3$	-	-
Уклёйка <i>Alburnus alburnus</i>	$1.3 \cdot 10^6$	$4.8 \cdot 10^3$	$7.4 \cdot 10^6$	$2.7 \cdot 10^7$
Густера <i>Blicca bjoerkna</i>	-	-	$1.2 \cdot 10^6$	$2.6 \cdot 10^5$
Плотва <i>Rutilus rutilus</i>	$3.3 \cdot 10^6$ - $6.2 \cdot 10^6$	$9.8 \cdot 10^3$ - $1.8 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^6$ - $2.5 \cdot 10^7$	$6.7 \cdot 10^5$ - $2.2 \cdot 10^7$
Пескарь <i>Gobio gobio</i>	$1.8 \cdot 10^5$	$6.6 \cdot 10^3$	$7.2 \cdot 10^5$ - $4.6 \cdot 10^7$	$3.7 \cdot 10^5$ - $2.2 \cdot 10^7$
Налим <i>Lota lota</i>	$6.1 \cdot 10^4$	$2.1 \cdot 10^4$	-	-
Кóлюшка <i>Gasterosteus aculeatus</i>	$1.6 \cdot 10^3$ - $9.8 \cdot 10^3$	$3.2 \cdot 10^3$ - $1.6 \cdot 10^5$	$9.8 \cdot 10^6$	$9.2 \cdot 10^4$
Ерш <i>Gymnocephalus cernua</i>	$1.9 \cdot 10^5$ - $4.4 \cdot 10^6$	$1.5 \cdot 10^4$ - $6.3 \cdot 10^4$	$1.7 \cdot 10^6$ - $4.9 \cdot 10^6$	$1.7 \cdot 10^5$ - $2.6 \cdot 10^6$
Окунь <i>Perca fluviatilis</i>	$2.6 \cdot 10^5$ - $4.7 \cdot 10^5$	$4.3 \cdot 10^3$ - $1.2 \cdot 10^4$	$2.6 \cdot 10^5$ - $4.7 \cdot 10^5$	$7.4 \cdot 10^5$ - $7.9 \cdot 10^6$

Микроорганизмы, населяющие кишечник рыб, обычно синтезируют комплекс протеаз. Так, некоторые штаммы *Ps. aeruginosa* продуцируют три фермента: две нейтрально-щелочные протеазы и эластазу (Лубянскене и др., 1989). У некоторых видов рыб доминируют бактерии р. *Lactobacillus* (Hagi et al., 2004; Hovda et al., 2007). В частности, *Lactobacillus casei casei* и *L. plantarum*, выделенные

из пищеварительного тракта карпа *Cyprinus carpio*, синтезируют трипсино- и пепсиноподобные протеиназы. При этом активность пепсиноподобных пептидаз у карпа примерно в 10 раз выше активности трипсинподобных пептидаз (Jankauskienė, Lesauskienė, 1995).

При изучении активности пептидаз микрофлоры, ассоциированной с потенциальными жертвами рыб, были выявлены значительные видовые различия (табл. 1.4). При этом выявленная у потенциальных объектов питания рыб активность пептидаз в ряде случаев близка таковой рыб.

Таблица 1.4.

**Активность пептидаз у потенциальных объектов питания рыб из Кучурганского водохранилища и их ассоциированная микрофлора, 20°C, pH 7.4 (по: Kuz'mina et al., 2017)**

Потенциальные объекты питания	Активность пептидаз, мкмоль/(г·мин)	
	Объект питания	Ассоциированная микрофлора
Зоопланктон	6.2±0.2 *	1.50±0.09*
Амфиподы (Sandhopper sp.)	3.3±0.12 *	2.40±0.13 *
Личинки хирономид	3.1±0.16 *	0.67±0.13
Олигохеты	3.0±0.13	1.20±0.1
Тарань	2.7±0.10	0.87±0.09
Ерш	4.0±0.23 *	1.90±0.11*
Красноперка	3.4±0.10 *	0.86±0.07
Бычок-песочник	3.2±0.23 *	0.90±0.07

*Примечание.* \* P < 0.05 по F-критерию при сравнении в столбцах минимальной активности пептидаз и активности пептидаз у других видов.

В ряде работ у микроорганизмов, выделенных из кишечника рыб выявлена активность амилазы (Hamid et al., 1979; Trust et al., 1979; Lesel et al., 1986; Das, Tripathi, 1991; Gatesoupe et al., 1997; Mickėnienė, Šyvokienė, 2008). Почти все изоляты родов *Enterobacter* и *Vibrio* обладают амилолитической активностью (Hamid et al., 1979). При изучении содержимого кишечника у ряда видов пресноводных рыб показано, что более 50 % штаммов сем. *Bacteroidaceae* и р.р. *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Clostridium* производят амилазу (Sugita et al., 1997). Позднее из кишечника плотвы *Rutilus rutilus*,

уклейки *Alburnus alburnus* и трехгорлой колюшки *Gasterosteus aculeatus* выделены бактерии р.р. *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* / *Shewanella*, ферменты которых эффективно разрушают углеводы (Mickėnienė, Šyvoikienė, 2008). У бактерий, выделенных из содержимого кишечника форели *Salmo trutta*, были найдены высокие значения амилолитической активности (Šyvoikienė et al., 1997). Амилолитическая активность кишечной микробиоты обнаружена у ряда видов рыб из Рыбинского (Kuz'mina et al., 2011) и Кучурганского (Kuz'mina et al., 2017) водохранилищ. При этом ферменты бактерий, связанных со слизистой оболочкой рыб, способны гидролизовать не только полисахарид крахмал, но и дисахарид сахарозу (Извекова, 2009). Энтеральная микробиота морских беспозвоночных также обладает ферментами, гидролизующими различные пищевые субстраты. Амилолитическая активность также была выявлена в организме потенциальных объектов питания рыб из Кучурганского водохранилища и ассоциированной микрофлоре (табл. 1.5).

Таблица 1.5.

**Амилолитическая активность у рыбных потенциальных жертв (рыб и беспозвоночных) и их ассоциированной микрофлоры при температуре 20°C и pH 7.4 (по: Kuz'mina et al., 2017)**

Потенциальные объекты питания	Амилолитическая активность, мкмоль/(г·мин)	
	Объект питания	Ассоциированная микрофлора
Зоопланктон	2.0±0.1*	1.1±0.07
Амфиподы ( <i>Sandhopper</i> sp.)	1.7±0.08	1.4±0.12*
Личинки хирономид	2.5±0.1 *	2.8±0.11*
Олигохеты	7.0±0.17*	5.9±0.11*
Дрейссена	4.6±0.12*	5.4±0.11*
Тарань	7.8±0.15*	6.2±0.14 *
Ерш	2.8±0.06 *	3.2±0.15 *
Красноперка	8.2±0.22 *	4.8±0.11 *
Бычок-песочник	6.0±0.23 *	1.7±0.08 *

Примечание. а Р < 0.05, б Р < 0.01, с Р < 0.001 по F-критерию при сравнении в столбцах минимальной амилолитической активности с таковой у других видов.

*Специфические ферменты.* Как известно, кишечная микрофлора обладает специфическими ферментами, способными разрушать такие соединения, как целлюлоза, хитин и другие. Использование целлюлозы в качестве источника питательных веществ требует наличия целлюлазы, которая расщепляет  $\beta$ -1,4-гликозидные связи в полимере с высвобождением глюкозы. Рыбы не могут синтезировать целлюлазу, но в их пищеварительном тракте есть аэробные и факультативные анаэробные микроорганизмы, которые помогают в переваривании растительных материалов (Trust, Sparrow, 1974). Активность целлюлазы предположительно экзогенного происхождения была обнаружена в пищеварительном тракте у нескольких видов рыб (Stickney, Shumway, 1974; Prejs, Blaszczyk, 1977; Lindsay, Harris, 1980). Активность целлюлазы выявлена в пищеварительном тракте у макрофитофага белого амура *Stenopharyngodon idella* (Lesel et al., 1986; Das, Tripathy, 1991). Позднее присутствие высокой активности целлюлазы было подтверждено при исследовании процессов пищеварения в кишечнике у травоядной рыбы *Aplodactylus punctatus*, обитающей в прибрежных водах Чили (Ojeda, Saceres, 1995). Также было показано, что эндосимбионты играют важную роль в переваривании стенок водорослей (Luczkovich, Stellwag, 1993).

Важно отметить, что активность целлюлазы стенки кишечника у фундулюса *Fundulus heteroclitus*, обитающего в естественных условиях была выше, чем у лабораторных животных, причем в кишечном содержимом была в 3.8 раза выше, чем в стенке кишечника (Moerland, 1985). Экзогенная природа целлюлазы была доказана тем, что ферментативная активность исчезала после введения рыбам антибиотиков (Stickney, Shumway, 1974). У малоголовой молот-рыбы *Sphyrna tiburo* выявлена активность  $\beta$ -гликозидазы, которая по мнению авторов, гидролизует продукты расщепления целлюлозы и других  $\beta$ -гликозидов, таких как ламинарин (Jhaveri et al., 2015).

Некоторые исследователи считают, что источником микрофлоры в кишечнике рыб являются объекты питания (Niederholzer, Hofer, 1979; Lindsay, Harris, 1980). Изучение плотвы *Rutilus rutilus* и красноперки *Scardinius erythrophthalmus* показало, что у рыб, питающихся растениями и детритом, активность целлюлазы ниже, чем у рыб, питающихся зоопланктоном или членистоногими. При этом авторы предположили, что активности целлюлазы, обнаруженной в кишеч-

ном содержимом ципринид, недостаточно для переваривания волокон, но достаточно (особенно у всеядных видов) для разрушения клеточных стенок (Niederholzer, Hofer, 1979). На популяцию микроорганизмов, продуцирующих ферменты в пищеварительном тракте рыб, может влиять состав пищи. Так, более высокая популяция целлюлолитических бактерий в пищеварительном тракте циррины белой *Cirrhinus mrigala*, была зарегистрирована в случае, когда рыбы получали пищу, содержащую ряску, по сравнению с рыбами, получавшими с пищей рыбную муку. При этом у рыб, получавших ряску, повышенная активность целлюлазы была отмечена в бактериальных штаммах CMF6 и CMH9 (Ghosh, Ray, 2014).

Вместе с тем предполагается, что выделенные из кишечника питающихся древесиной сомов микроорганизмы, обладающие целлюлолитической активностью, относятся к резистентной микрофлоре пищеварительного тракта (Nelson et al., 1999). Действительно, в жидкости кишечника и микробном экстракте «древесных» сомов (*Panaque cf. nigrolineatus*, *P. nocturnus*, *Hypostomus pyrineusi*, *Pterygoplichthys disjunctivus*) выявлены активности ламинариказы, целлюлазы и ксиланазы. Опыты показали, что «древесные» сомы не зависят от эндосимбионтов для гидролиза неперевариваемых полисахаридов (German, Bittong, 2009). Филогенетический анализ микробных сообществ в разных частях желудочно-кишечного тракта «древесной» рыбы *Panaque nigrolineatus* выявил наличие фило типов, сходных с таковыми микроорганизмов, обладающих целлюлазной и азотофиксирующей активностями (McDonald et al., 2012).

В нескольких исследованиях показано, что энтеральная микробиота обладает ферментами, гидролизующими хитин. В ряде работ показано, что хитиназа, обнаруживаемая в кишечнике рыб, имеет бактериальное происхождение (Goodrich, Morita, 1977, Danulat, Kausch, 1984; Itoi et al., 2006). Действительно, некоторые изоляты родов *Vibrio*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter* и *Pseudomonas* обладают активностью хитиназы (Hamid et al., 1979). Наиболее часто хитиназа обнаруживается в кишечнике рыб, потребляющих ракообразных (Colin, Pérès, 1971, Colin, 1972; Fange et al., 1979). Этот фермент расщепляет хитин до уровня димеров N-ацетил-D-глюкозамина (NAG), который затем может быть разрушен с помощью N-ацетил-β-D-глюкозоамидазы (NAGase), которая также находится в пищеварительном тракте рыб.

Фермент, продуцируемый энтеральной микробиотой, наиболее активен при pH 4-5 (Jeuniaux, 1983) или 5.1-6.1 (Danulat, Kausch, 1984).

У акулы *Sphyrna tiburo* выявлена активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. По мнению авторов, N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза переднего и спирального кишечника имеет эндогенное происхождение. Однако высокий уровень активности N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в толстом кишечнике, включая его содержимое, указывает на микробное происхождение активности (Jhaveri et al., 2015). В тканях кишечной стенки и микробном экстракте «древесных» сомов (*Panaque cf. nigrolineatus*, *P. nocturnus*, *Hypostomus pyrineusi*, *Pterygoplichthys disjunctivus*) также обнаружена активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Однако авторы не уверены в том, что это эндосимбионты, гидролизующие неперевариваемые полисахариды (German, Bittong, 2009). Авторы объясняют этот вывод рядом причин. Однако довольно высокий уровень мальтазы, β-глюкозидазы и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в микробных экстрактах дает возможность предположить, что, не будучи эндосимбионтами, они могут участвовать в процессах пищеварения у рыб.

В настоящее время корректно оценить вклад ферментов микроорганизмов, реализующих симбионтное (симбиотическое) пищеварение невозможно, но возможно сравнение различных характеристик ферментов энтеральной микробиоты, а также ферментов, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника и химуса. Не вызывает сомнения тот факт, что ферменты, реализующие процессы симбионтного пищеварения в ряде случаев могут компенсировать низкий уровень активности ферментов консументов, снижая их энергетические и пластические затраты на синтез собственных ферментов (Кузьмина, 2005, 2015; Kuz'mina et al., 2011, 2017).

## 1.6. Индуцированный аутолиз

Механизм индуцированного аутолиза был описан в работах Уголева (1985, 1991). Однако задолго до его открытия в литературе был поднят вопрос об участии ферментов жертвы в процессах пищеварения рыб. Янчаржик (Jančařík, 1956, 1964), а позднее Дабровский и Глоговский (Dabrowski, Glogowski 1977a,b) обратили внимание на необходимость разработки подходов к оценке роли экзогенных

ферментов, поступающих в пищеварительный тракт в составе объектов питания рыб. Последними авторами вклад экзогенных ферментов было предложено оценивать с помощью протеолитического индекса, то есть отношения активности протеиназ в суточном рационе к активности соответствующих ферментов во всех органах пищеварения. В более поздних работах, касающихся исследования процессов пищеварения у личинок рыб, были использованы сходные методические подходы (Lauff, Hofer, 1984; Munila-Moran et al., 1990; Oozeki, Bailey, 1995). Однако, несмотря на то, что в ряде работ была установлена значительная роль протеиназ жертвы в процессах пищеварения у рыб (Lauff, Hofer, 1984; Munila-Moran et al., 1990), в большинстве случаев сравнение протеолитической активности у консументов и их жертв не позволило выявить заметный вклад экзогенных ферментов. В частности, вклад трипсиноподобных гидролаз коловраток *Rotatoria* в процессы переваривания личинок минтая *Theragra chalcogramma* не превышает 5.9 % от общей активности ферментов трофических партнеров (Oozeki, Bailey, 1995).

Низкий уровень активности трипсиноподобных ферментов жертвы позволил некоторым авторам поставить под сомнение важную роль экзогенных ферментов в процессах пищеварения у рыб (Kurokawa et al., 1998), тогда как другие авторы предположили, что ферменты жертвы служат катализаторами протеиназ, синтезированных в виде зимогенов (Dabrowski, 1979; Kolkowski et al., 1993). Результаты сопоставления количества эндогенных и экзогенных ферментов, особенно у личинок сельди *Clupea harengus*, позволили сделать вывод о том, что экзогенные ферменты, потребляющиеся с живой пищей (коловратки, науплии артемии, науплии копепод), имеют второстепенное значение для всего пищеварительного процесса у личинок морских рыб (Pedersen, Hjelmeland, 1988; Pedersen, Andersen, 1992).

Однако в большинстве цитируемых работ в качестве пищи исследовали рачковый зоопланктон, а изучаемые ферменты, как правило, ограничивались трипсином. В то же время добавление личинок хирономид в комбикорм в количестве 0.1–0.4 % от массы рыб повышает активность пищеварительных протеаз и липаз, а также снижает затраты основных групп питательных веществ на единицу прироста массы перьев карпа на 10–23 % (Щербина, Першина, 1984). В результате замены 1 и 2 % массы комбикорма стерляди

*Acipenser ruthenus* личинками хирономид установлено увеличение по сравнению с контролем массы тела и обеспеченности рыб пептидазами от 29.1 до 36.6 мкмоль/(мин \* кг массы тела). При этом количество лейкоцитов возрастало от 35.2 до 42.8 тыс./мкл, число лимфоцитов – от 79.0 до 89.0% (Скворцова и др., 2019, в печати). Эти данные указывают на улучшение процессов пищеварения и физиологического состояния стерляди, что свидетельствует о целесообразности включения живых кормов, в частности личинок хирономид, в качестве добавки к комбикормам.

Важно отметить, что активность пептидаз всего организма потенциальных жертв рыб в расчете на 1 г влажной массы ткани, как правило, значительно ниже активности одноименных пептидаз слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб. Эти данные не объясняют высокую скорость пищеварения, особенно у желудочных рыб. В то же время высокая скорость пищеварения может объяснить механизм индуцированного аутолиза.

Механизм индуцированного аутолиза был описан в начале 80-х годов XX века (Уголев, 1980, 1985; Уголев, Цветкова, 1984). Согласно традиционным представлениям, в процессе желудочного пищеварения при pH 2.0-3.0 наблюдается кислотная денатурация белковых компонентов пищи, значительно увеличивающая способность ферментов разрушать белки. Однако, когда добыча проглатывалась целиком, она быстро переваривалась в желудке. Принимая во внимание эти и другие факты, А. М. Уголев (1980) для объяснения высоких скоростей переваривания добычи в полости желудка предложил гипотезу индуцированного аутолиза.

А. М. Уголев подчеркивал, что скорость диффузии ферментов консумента внутрь жертвы ограничена их довольно значительной молекулярной массой. Следовательно, гидролазы пищеварительных соков консументов, действуют только на поверхность тела жертвы. В то же время консумент индуцирует переваривание добычи своими собственными ферментами, активируя последние. Особую роль в этом процессе играют водородные ионы. Согласно современным представлениям, скорость диффузии протонов в организм жертвы примерно в 1000 раз выше, чем скорость диффузии ферментов консументов (Уголев, 1985). Оптимальные значения pH для большинства аутолитических ферментов, локализованных

в лизосомах, находятся в зоне 3.0 – 6.0 (De Duve, 1963; Dean, 1980; De Duve, Wattiaux, 1966). Важно отметить, что индуцированный аутолиз является частным случаем аутофагии. Этот термин был введен Де Дювом (De Duve, 1963). Известно, что аутофагия находится на низком базальном уровне и увеличивается в различных тканях при дифференцировке и процессах реконструкции (De Duve, Wattiaux, 1966). В последующие годы во многом благодаря работам, выполненным под наблюдением лауреата Нобелевской премии Есинори Осуми (Mizushima et al., 1998, 1999; Shintani et al., 1999; Hanada et al., 2007), были описаны тонкие механизмы аутофагии.

Обычно величина pH внутриклеточной среды близка к нейтральным значениям, а лизосомальные ферменты, катализирующие деградацию различных клеточных компонентов, выполняют функцию регулятора (Немова, 1996; Высоцкая, Немова, 2008). Однако после гибели организма, pH его тканей из-за ослабления аэробных окислительных процессов и усиления гликолиза смещается в кислотную зону. При этом ионы водорода, секретлируемые желудочными железами консумента, и посмертное подкисление тканей жертвы повышают проницаемость лизосомальных мембран и активируют лизосомальные ферменты (Уголев, 1985; Кузьмина, Цветкова, 2001). В этих условиях активность лизосомальных ферментов, особенно катепсинов, резко возрастает (Dean, 1980; Ugolev, 1989), способствуя перевариванию жертвы, размер которой может значительно превышать размеры консумента (рис. 1.7).

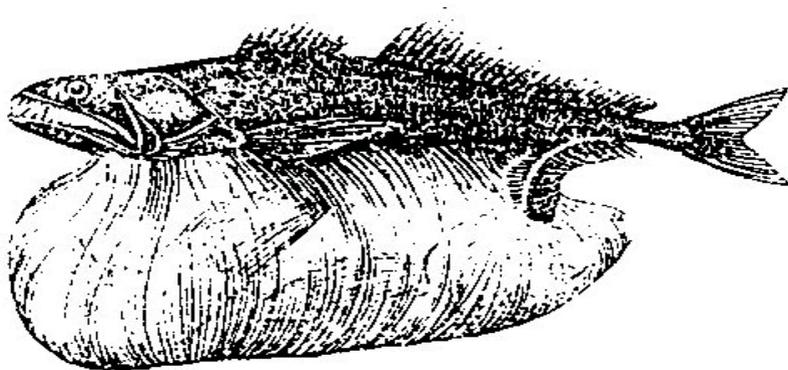


Рис. 1.7. Черный хиазмод *Chiasmodon niger*, проглотивший жертву (по: Расс, 1971)

Известно порядка 70 лизосомальных ферментов, способных разрушать практически все биополимеры, входящие в состав жертвы (белки, липиды, углеводы нуклеиновые кислоты, и другие) при кислых значениях рН (Покровский, Тутельян, 1976; Dean, 1980).

Катепсины, гидролизующие белки, делятся на три группы в зависимости от структуры активного центра: сериновые эндопептидазы – катепсин А и G, аспаргатные эндопептидазы – катепсин D и E, цистеиновые эндопептидазы – катепсин В, С, Н, К, L, O, S, W, Z или X (Enzyme nomenclature, 1992). Спектр ферментов у потенциальных жертв разнообразен. Важно отметить, что катепсины А, В, С, D, E, H, L и X были обнаружены в различных тканях рыб, в том числе в лизосомах (Aranishi et al., 1997a, b; Hiraiwa, 1999; Visessanguan et al., 2001). Катепсины А, В, С, D, E, L и X были выделены из тканей беспозвоночных (Ashie, Simpson, 1997; Capasso et al., 1999; Butler et al., 2001; Aoki et al., 2003; Teschke, Saborowski, 2005).

Ранее было показано, что катепсины В, D, H и L, участвующие в начальных стадиях протеолиза, происходящего в лизосомах, могут играть важную роль в аутолизе (Yamashita, Kanagaya, 1990a, b; Aranishi et al., 1997a, b; Visessanguan et al., 2001). Катепсины А и С, будучи экзопептидазами, не могут активно разрушать нативный белок, в то время как катепсины E, F, G, N, S активно участвуют в этом процессе (Raksakulthai, Naard, 1992; Немова, 1996). Однако позднее подчеркивалось, что цистеиновые пептидазы, такие как катепсины L, V, S, K и F, являются эндопептидазами, тогда как катепсины В, X, С и H – экзопептидазами. При этом механизм действия катепсинов O и W остается неизвестным (Verma et al., 2016).

Предполагается, что катепсины во время переваривания жертв действуют совместно с трипсином и химотрипсином висцеральных органов (Кузьмина, 2005, 2015), как это наблюдается во время ферментации (Heu et al., 1997). Наибольший вклад в гидролиз казеина, в сочетании с пепсином и трипсином, вероятно, вносят катепсины D и E, в гидролиз гемоглобина, в сочетании с химотрипсином, катепсины D, E, A и G (Немова, 1978; Панин, Маянская, 1987). В ряде работ было показано, что активность пептидаз и гликозидаз в целом организме гидробионтов (Mollusca, Annelidae, Arthropoda, Vertebrata) сопоставима с активностью гидролаз, реализующих процессы полостного и мембранного пищеварения у консументов (Кузьмина, 1993, 1999).

Однако позднее было показано, что доля одноименных ферментов объектов питания рыб благодаря их большой массе может значительно превышать активность ферментов консументов (Кузьмина, 2000, 2005, 2015, Kuz'mina, Golovanova, 2004; Кузьмина, Скворцова, 2001, 2003). Так, активность пептидаз во всем организме реальной жертвы (плотва *Rutilus rutilus*) может быть выше, чем во всей слизистой оболочке желудка консумента (щука *Esox lucius*) в 5.5 раза (рис. 1.8).

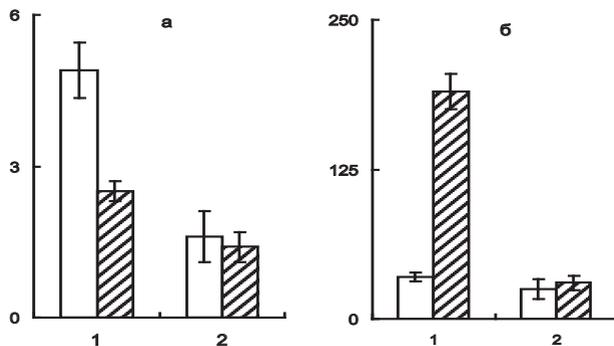


Рис. 1.8. Протеолитическая активность (слева) и totalная протеолитическая активность (справа) в желудке (1) и кишечнике (2) щуки *Esox lucius* и ее жертве (плотва *Rutilus rutilus*, I этап пищеварения), pH 3.0 (по: Кузьмина, 2000)

*Примечание.* Светлые столбики – слизистая оболочка, темные столбики – содержимое пищеварительного тракта. По вертикали: слева –  $\Delta E280 / (г \cdot мин) \cdot 10^{-1}$ , справа –  $\Delta E280 / мин \cdot 10^{-1}$ .

По мнению ряда авторов, в процессах аутодеградации жертвы участвуют лизосомальные катепсины и, возможно, некоторые специфические пептидазы (Peaucellier, 1983; Guionie et al., 2003), но не сериновые пептидазы, связанные с процессами пищеварения у беспозвоночных (Reid, 1977; Vonk, Western, 1984; Gildberg, 1988, Hu, Leung, 2007) и безжелудочных рыб (Gildberg, 1988).

При изучении потенциальных жертв ихтиофагов, обитающих в Рыбинском водохранилище, обнаружено, что активность гликозидаз чрезвычайно низка. В объектах питания планкто- и бентофагов активность гликозидаз в некоторых случаях сравнима с таковой слизистой оболочки кишечника рыб. Действительно, уровень амилолитической активности, рассчитанный стандартным образом, при 20°C (pH 7.4) минимален в пробах рачкового зоопланктона, в котором доминирует

*Diaptomus sp.* ( $1.2 \pm 0.1$  мкмоль/(г•мин)), максимален – у прудовика *Lymnaea stagnalis* ( $7.8 \pm 0.8$  мкмоль / (г мин)). У представителей зоопланктона, в котором преобладают *Bosmina sp.* или *Polyphemus pediculus*, амилитическая активность в 2–3 раза выше. У личинок хирономид *Chironomus plumosus* и олигохет *Tubifex tubifex* амилитическая активность еще выше – 4–5 мкмоль/(г•мин). При этом амилитическая активность у массовых видов бентических форм сопоставима с амилоидной активностью слизистой оболочки кишечника бентофагов. Уровень казеинлитической активности пептидаз (рН 7.4), напротив, у этих видов значительно ниже, чем у зоопланктона – менее 0.3 мкмоль/(г•мин) (Кузьмина, 1999 а).

Уровень гемоглобинлитической активности пептидаз (рН 3.0), характеризующий активность катепсинов, у всех исследованных гидробионтов значительно выше и в некоторых случаях сопоставим с уровнем пептидаз слизистой оболочки. Так, протеолитическая активность во всех тканях *Viviparus viviparus* соответствует  $1.53 \pm 0.09$ , *Unio pictorum* –  $2.31 \pm 0.26$ , зоопланктона –  $1.49 \pm 0.11$  мкмоль/(г мин). Активность пептидаз в мышцах карасей *Carassius carassius* и *Carassius auratus* несколько ниже, чем у беспозвоночных:  $0.94 \pm 0.05$  и  $1.24 \pm 0.05$  мкмоль / (г • мин) соответственно. Однако данные, относящиеся к висцеральным органам и икре *Carassius auratus*, чрезвычайно близки таковым у моллюсков и зоопланктона –  $1.49 \pm 0.01$  и  $1.44 \pm 0.09$  мкмоль/(г • мин), соответственно. В то же время активность ферментов изменяется в зависимости от возраста рыбы (табл. 1.7). Эти данные свидетельствуют о том, что вклад ферментов жертвы в процессы пищеварения рыб зависит в основном от их массы.

Таблица 1.7.

**Активность пептидаз в организме мальков щуки *Esox lucius***  
(по: Кузьмина, 2014)

Дата	Масса рыб, г	Активность пептидаз			
		Казеинлитическая активность		Гемоглобинлитическая активность	
		1	2	1	2
5.07	7.3±0.5	1.27±0.38	9.27±1.45*	3.10±0.46	22.63±2.97*
9.07	11.3±1.4	1.00±0.12	11.30±1.24*	1.76±0.22	19.88±4.40*

Примечание. 1 – мкмоль / (г • мин), 2 – мкмоль / мин. \* – различия достоверны между 1 и 2 ( $p \leq 0.05$ ).

Кроме того, в последние годы значительное внимание уделяется  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимому протеолизу (Miyachi, 1989; Немова, 1996; Лысенко и др., 2011). Обе формы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых нейтральных протеиназ (кальпаин I и кальпаин II) могут функционировать в тканях одновременно (Немова, 1996). Помимо хорошо известных механизмов протеолиза, в разрушении клеток могут принимать участие цитозольные каспазы, активные при нейтральных значениях pH, а также киназа mTOR, играющая важную роль в процессах апоптоза (Karahi et al., 2010; Мартынова, 2012) и аутофагии (Зубова и др., 2012). Показано, что mTOR регулирует процессы самоуничтожения клеток, интегрируя сигналы от нутриентов, в частности аминокислот и глюкозы, ростовых факторов, гормонов, а также сигналов, инициированных стрессом и асфиксией (Зубова и др., 2012).

Вклад ферментов жертвы в процессы пищеварения у рыб зависит от множества экзогенных и эндогенных факторов, в том числе вида и типа питания трофических партнеров. Важнейшими факторами, влияющими на аутолиз, являются температура, pH, содержание кислорода, активаторы и ингибиторы, голодание, а также протеолитические ферменты микроорганизмов, населяющих макроорганизм. Известно о влиянии этих факторов на активность различных ферментов (Кузьмина, Цветкова, 2001). Так, длительное голодание вызывает увеличение активности кислой фосфатазы, ДНКазы и РНКазы в печени, почках и селезенке у лосося *Salmo salar* в нерестовый период и период созревания гонад (Сидоров и др., 1980). Активность кислой фосфатазы, РНКазы,  $\beta$ -глюкозидазы и катепсина D у карпа *Cyprinus carpio*, не питающегося при низкой температуре, снижается к середине зимы, а затем увеличивается (Крупнова, 1983).

## 1.7. Взаимодействие различных типов пищеварения

Вопрос, касающийся взаимодействия процессов, происходящих в пищеварительном тракте, был поставлен И. П. Павловым (1951), сравнивавший пищеварение с конвейером. В настоящее время не вызывает сомнения, что эффективность пищеварительной функции в значительной мере базируется на интегральной деятельности ее отдельных элементов, базирующейся на тесном взаимодействии всех типов пищеварения в процессе последовательной

деполимеризации субстратов (Уголев, 1985). Ранее указывалось, что этот принцип основан на том, что элементы, порознь дающие небольшой эффект, вместе реализуют значительно больший, чем их арифметическая сумма (Уголев, Кузьмина, 1993).

При этом подчеркивалось, что для позвоночных животных характерно сочетание полостного пищеварения как основного механизма начальных этапов гидролиза биополимеров и мембранного пищеварения, как основного механизма промежуточных и заключительных этапов гидролиза и перехода к процессам всасывания. Указанное взаимодействие в значительной мере определяется размерами пор щеточной каймы и сети гликокаликса, которые делают невозможным быстрое проникновение крупных молекул и надмолекулярных агрегаций из зоны полостного в зону мембранного пищеварения (рис. 1.9).

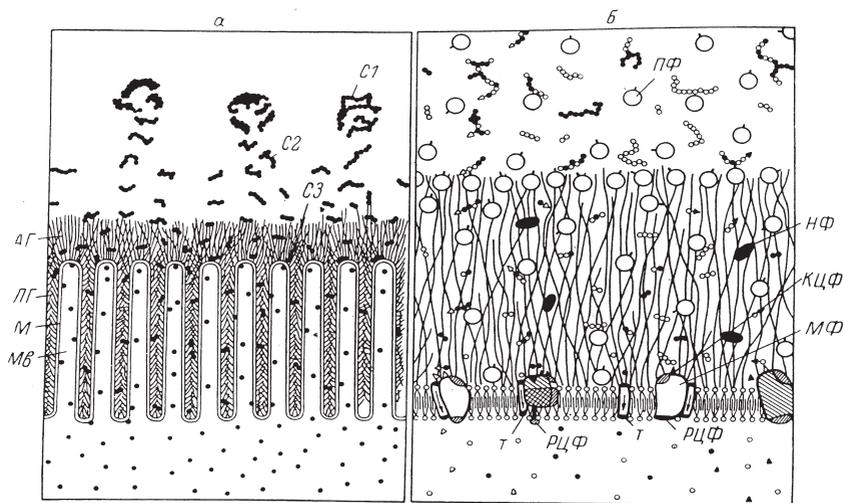


Рис. 1.9. Схема строения щеточной каймы энтероцитов и взаимоотношения между полостным и мембранным пищеварением (по: Уголев, 1985)

Обозначения: а – схема последовательной деполимеризации пищевых субстратов в полости и на поверхности энтероцитов, б – фрагмент липопротеиновой мембраны с адсорбированными и собственно кишечными ферментами. М – мембрана, Мв – микроворсинки, АГ – апикальный гликокаликс, ЛГ – латеральный гликокаликс, С1, С2, С3 – субстраты, ПФ – панкреатические ферменты, МФ – мембранные ферменты, Т – транспортная система, РЦФ – регуляторные центры ферментов, КЦФ – каталитические центры ферментов, НФ – неэнзиматические факторы.

Как показывает этот рисунок, для реализации мембранного гидролиза необходим предварительный гидролиз биополимеров в полости кишечника. Действительно, расстояние между микроворсинками составляет в среднем 1–2 мкм, а расстояние между нитями гликокаликса в сотни раз меньше (Уголев и др., 1992). При этом химическая природа гликокаликса зависит от соотношения олигосахаридных цепей гликопротеидов и гликолипидов плазматической мембраны, концевые фрагменты которых определяют рецепторную функцию гликокаликса. Благодаря наличию рецепторов существует избирательность адсорбции различных молекул на структурах гликокаликса, определяющая доступ макромолекул к апикальной мембране энтероцитов (Уголев, 1972, 1985; Морозов и др., 1988).

Гликокаликс препятствует поступлению к апикальной мембране энтероцитов различных субстанций, размер которых превышает 0.01–0.02 мкм (реже до 0.1 мкм). Через апикальную мембрану во внутреннюю среду организма по градиенту концентрации могут проникать лишь небольшие молекулы, растворенные в воде.

Диффузии сахаров препятствуют поры радиусом, несколько превышающим 0.4 нм (Никольский, 1977). Вследствие этого проницаемость слизистой оболочки тонкой кишки млекопитающих для водорастворимых молекул массой 300–500 D и менее ограничена. Предполагается, что молекулы углеводов, способные проникать в зону щеточной каймы, состоят максимум из 10–20 гликозидных остатков, белков – из 10–80 аминокислотных остатков. Эти факты позволили описать функционирование апикальной мембраны энтероцитов по принципу молекулярного сита (Уголев, 1972, 1985).

Исключением является поступление во внутреннюю среду организма различных макромолекул за счет эндоцитоза (Уголев, Кузьмина, 1993). Наличие в составе липидов слизистой оболочки рыб большого количества ненасыщенных жирных кислот, особенно жирных кислот  $\omega 3$  типа (Kemp, Smith, 1970; Кузьмина и др., 1982, 1984; Buddington et al., 1993) предполагает близкое соотношение жирных кислот в составе мембран энтероцитов. Следовательно, через апикальные мембраны энтероцитов рыб могут проникать большие по размеру молекулы по сравнению с теплокровными животными.

Также важно подчеркнуть, что благодаря непрерывному элиминированию промежуточных продуктов гидролиза в зону мем-

бранного пищеварения происходит интенсификация полостного пищеварения. В свою очередь элиминирование окончательных продуктов гидролиза вследствие их транспорта внутрь энтероцитов интенсифицирует мембранное пищеварение. У беспозвоночных, особенно у простейших, внутриклеточное пищеварение, напротив, является основным механизмом, обеспечивающим процессы ассимиляции пищи. У рыб этот механизм развит в большей степени, чем у млекопитающих (Уголев, Кузьмина, 1993). Взаимосвязь различных типов пищеварения представлена на рис. 1.10.

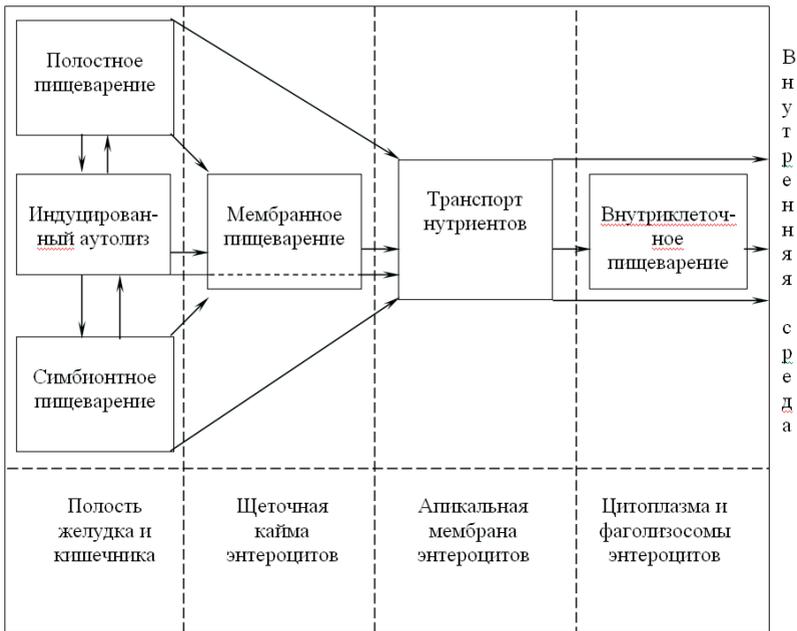


Рис. 1.10. Схема пищеварения у рыб (по: Кузьмина, 1996)

Как показывает этот рисунок, симбионтное пищеварение и индуцированный аутолиз, реализующиеся в полостях желудочно-кишечного тракта, тесно связаны с полостным пищеварением. Действительно, практически все биотрофы используют бактерии и другие симбионты в качестве дополнительного источника гидролаз. Поскольку зона мембранного пищеварения условно считается стерильной, а основная масса микроорганизмов сосредоточена

в полости кишечника, ясно, что микробиота, обеспечивающая процессы симбионтного пищеварения, существенно увеличивает пул полостных ферментов. Аналогичную роль, как показано выше, играет механизм индуцированного аутолиза, особенно у желудочных рыб. Однако, независимо от источника ферментов, образующиеся в полости кишечника или поступающие из желудка продукты гидролиза биополимеров могут подвергаться дальнейшей деградации за счет мембранного пищеварения или сразу поступать на транспортные системы апикальной мембраны энтероцитов и в последующем разрушаться благодаря внутриклеточному пищеварению.

Кроме того, в настоящее время большое внимание уделяется исследованиям процессов, происходящих в пищеварительном тракте, с точки зрения теории химических реакторов (Penry, Jumars, 1987). В рамках этой теории предполагается существование трех идеальных типов реактора. Первый тип: «batch reactors», или шихтовые реакторы, в которых реагенты непрерывно перемешиваются во время реакции, а затем опорожняются после определенного периода реакции. Второй тип: «plug-flow reactors (PFR's)» или реакторы с пробковым (поршневым) режимом потока, в которые непрерывно поступают реагенты, а продукты реакции непрерывно выходят без смешивания вдоль пути потока. Третий тип: «continuous-flow, stirred-tank reactors (CSTR's)» или реакторы с непрерывным потоком (реакторы с перемешиванием), в которые непрерывно поступают реагенты, а продукты реакции непрерывно покидают его.

Авторы использовали уравнения баланса массы, чтобы определить идеальную «кишечно-реакторную» конфигурацию для двух основных типов пищеварительных реакций. В каталитических (то есть ферментативных) реакциях скорость зависит от концентрации субстрата в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен. В автокаталитических реакциях (в случае микробной ферментации) скорость реакции представляет собой комплексную функцию концентрации субстрата и концентрации микробов. В автокаталитических реакциях максимальная скорость реакции наблюдается при промежуточной, а не при самой высокой концентрации реагента.

«Plug-flow reactors (PFR's)» или реакторы с пробковым (поршневым) режимом потока, поддерживают градиент концентраций реагентов и, следовательно, градиент скорости реакции от более

высоких значений вблизи входа в реактор до более низких значений вблизи выхода из реактора. Авторы пришли к выводу, что PFR является лучшим вариантом для процессов пищеварения, которое основано на каталитических ферментативных реакциях. Поэтому у разных видов многоклеточных животных преобладает кишечник в виде трубки. Если в дополнение к каталитическим реакциям важны ферментационные автокаталитические реакции, то скорость ферментации максимизируется. Тогда часть кишечника функционирует по третьему типу (Penry, Jumars, 1987; Karasov et al., 2011).

Теория химических реакторов использовалась для моделирования пищеварительных процессов у морских травоядных рыб (Horn, Messer, 1992). Авторы описали процессы, происходящие в желудке, как «batch» (шихтовый реактор) или CSTR (непрерывное перемешивание), в кишечнике – как проточный реактор (PFR), а в задней кишке – как CSTR. Другие структуры, способствующие механической обработке пищи (жаберные тычинки, глоточные зубы и мышечные желудки) были классифицированы как входы (ворота). Критерием оптимальности для модели было переваривание самого питательного вещества за минимальный промежуток времени. Кроме того, авторы предполагали, что ферментация у рыб с кишечником, в котором процессы происходят по типу PFR, скорее всего, будут происходить за счет микроорганизмов, попадающих с пищей, а не благодаря эндосимбионтам. Изучение активности целлюлазы, амилазы и пептидазы в содержимом 4-х участков желудочно-кишечного тракта у *Aplodactylus punctatus* позволило представить ферментативную активность нисходящих градиентов в виде реактора с непрерывным потоком, проточного реактора (PFR) и реактора с перемешиванием (CSTR) (Ojeda, Caceres, 1995).

Сопоставление процессов пищеварения у травоядных рыб *Campostoma anomalum*, *C. ornatum*, *C. oligolepis* и *C. pauciradi* (р. *Campostoma*), а также у хищного *Nocomis micropogon* (р. *Nocomis*), входящих в сем. *Syngnidae*, подтвердило гипотезу о том, что мелкие травоядные животные имеют кишечники, функционирующие по типу PFR. Активность амилазы, трипсина и липазы у видов рода *Campostoma* снижалась в дистальной части пищеварительного тракта (исключение – активности мальтазы и аминопептидазы). Концентрация белка и липидов также снижалась в дисталь-

ном отделе кишечника, тогда как концентрации короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) и масса содержимого кишечника не были локализованы в одной области кишки, что наряду с неспециализированной морфологией кишечника рыб р.р. *Campostoma* и *Nocomis* позволила предположить, что их кишечника функционируют по типу PFR. Различия между травоядными видами р. *Campostoma* и плотоядным видом р. *Nocomis* показывают, что кишки травоядных видов и плотоядного вида функционируют по-разному, что, скорее всего, связано с качеством и способом потребления пищи (German, 2009). Позднее было высказано предположение, что у травоядных рыб эволюция происходила в пределах спектра двух стратегий пищеварения. Первая стратегия заключалась в максимизации скорости, высоком потреблении, быстром прохождении пищи через кишечник и слабом участии микроорганизмов в переваривании пищи. Вторая стратегия заключалась в максимизации процесса, характеризующегося сдержанным потреблением, более медленным транзитом пищи через кишечник и большей зависимостью от участия микрофлоры в расщеплении пищи в задней кишке (German et al., 2015).

## 1.8. Заключительные замечания

Прежде всего, следует отметить, что у рыб, находящихся на низших ступенях филогенетического развития позвоночных, пищеварительная система имеет структуры, обеспечивающие последовательное деструктурирование объектов питания до уровня молекул, способных преодолеть эпителиальный барьер пищеварительного тракта. Особую роль в реализации процессов пищеварения играет специализированный эпителий пищеварительной системы. При этом важно отметить значительную вариабельность морфологических признаков и сходство цитологических. В наибольшей степени это касается ультраструктуры эпителиоцитов кишечника (энтероцитов, бокаловидных клеток, эндокриноцитов), имеющих сходное строение у рыб разных видов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005).

Несмотря на исключительное видовое разнообразие (600 видов хрящевых, 45 видов хрящевых ганоидов и более 20000 видов пресноводных и морских костистых рыб) и различия в спектре

и типах питания рыб, многие закономерности пищеварения являются общими для всех рыб и других позвоночных (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005, 2015). Действительно, для рыб описано полостное, мембранное, внутриклеточное и симбионтное пищеварение, а также индуцированный аутолиз. Рыбы и другие позвоночные имеют сходные проксимально-дистальные и радиальные градиенты одноименных гидролаз. Однако у рыб в большинстве случаев активность одноименных ферментов, реализующих гидролиз биополимеров и надмолекулярных агрегаций, ниже, чем у млекопитающих и птиц. Довольно низкий уровень активности пищеварительных ферментов у рыб, вероятно, обусловлен несколькими причинами: 1. низким уровнем их филогенетического развития, 2. меньшей интенсивностью метаболизма, как пойкилотермных животных, 3. обитанием рыб в «гипогравитационной» среде (Уголев, Кузьмина, 1993).

Эффективность пищеварительной функции основана на тесном взаимодействии всех типов пищеварения при последовательной деградации пищевых субстратов (Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005, 2015). Однако на некоторых стадиях онтогенеза рыб, особенно у личинок, мембранное пищеварение является преобладающим механизмом гидролиза питательных веществ. Также важно отметить существование тесного взаимодействия между индуцированным аутолизом и полостным пищеварением. Несмотря на то, что вклад ферментов, реализующих процессы симбионтного переваривания в общем процессе пищеварения, не установлен, этот механизм тесно связан с полостным, а также с мембранным и внутриклеточным гидролизом нутриентов. Внутриклеточное пищеварение играет особенно важную роль у рыб в случае, когда макромолекулы компонентов пищи не разрушились до уровня мономеров ферментами, обеспечивающими другие типы пищеварения (Кузьмина, 2005, 2015).

Вместе с тем многие вопросы, связанные с корректной оценкой механизмов пищеварения и активности ферментов, обеспечивающих различные типы пищеварения, требуют дальнейшего детального изучения. Действительно, ранее не подвергалось сомнению, что в полости желудка и кишечника, как правило, функционируют ферменты, секретируемые гастроцитами и поджелудочной железой.

Однако наличие индуцированного аутолиза и симбионтного пищеварения свидетельствует о сложной системе взаимоотношений ферментов, синтезируемых консументами, объектами их питания и симбионтной микробиотой, что затрудняет корректную оценку процессов полостного пищеварения. Снять некоторые вопросы позволяет использование для моделирования пищеварительных процессов у рыб теории химических реакторов. Однако многообразие типов питания и кормовой базы рыб не позволяет унифицировать имеющиеся сведения.

Также нет единого мнения относительно наличия в кишечнике рыб тех или иных симбионтов. В англоязычной литературе в качестве «симбиотической» микробиоты рассматриваются лишь микроорганизмы, синтезирующие специфические ферменты. При этом дискутируется вопрос о том, постоянно ли они обитают в кишечнике или привносятся объектами питания рыб и относительно быстро выводятся из организма. При этом спектр гидролаз, синтезируемых микробиотой, включает не только специфические ферменты. Состав индигенной микробиоты, формирующийся на самых ранних этапах онтогенеза, достаточно стабилен, и участие ее ферментов в процессах пищеварения не вызывает сомнения. Состав транзитной микробиоты изменчив, а ферменты могут функционировать в кишечнике в течение нескольких часов. Этого времени достаточно, чтобы и «универсальные», и специфические гидролазы могли участвовать в деполимеризации различных компонентов пищи рыб.

Помимо этого, нет полной ясности в отношении ферментов реализующих мембранное пищеварение. Наличие относительно высокой активности пищеварительных гидролаз в строме не позволяет точно оценить активность ферментов, реализующих этот тип пищеварения. Несомненно, что задачей будущего является уточнение соотношения активности ферментов эпителия и стромы у рыб разных видов. Также важна разработка доступных методов, позволяющих дифференцировать активность ферментов щеточной каймы энтероцитов, нижележащих слоев эпителия и стромы. Вместе с тем наличие ферментов стромы, по всей вероятности, не влияет на характеристики большинства мембранных ферментов, поскольку значительная часть этих ферментов имеет панкреатическое происхождение. Ранее предполагалось, что ферменты стромы выпол-

няют защитную функцию (Кузьмина, 1999). Вместе с тем можно предположить, что функции ферментов стромы значительно шире. В частности можно выделить процессы, происходящие в постэпителиальных слоях слизистой оболочки, в отдельный тип пищеварения и обозначить его термином «постэпителиальное пищеварение». Признание этого типа пищеварения приведет к усложнению приведенной выше схемы пищеварения. Вместе с тем ясно, что усложнение представлений о механизмах пищеварения не только не противоречит, но и хорошо согласуется с идеей И. П. Павлова (1951) о существовании конвейера, позволяющего пищеварительной системе эффективно функционировать благодаря тесному взаимодействию всех типов пищеварения в процессе последовательной деполимеризации субстратов (Уголев, 1985).

## **Глава 2. Активность одноименных ферментов пищеварительного тракта консументов, их потенциальных объектов питания, энтеральной и ассоциированной микрофлоры**

Известно, что полостное и мембранное пищеварение у рыб и ряда других гидробионтов реализуют ферменты близкие по структуре и субстратной специфичности таковым млекопитающих. В желудке рыб белки гидролизуются аспаргатными эндопептидазами, такими, как пепсины А (КФ 3.4.23.1) и В (КФ 3.4.23.2), а также гастринсин (КФ 3.4.23.3), в кишечнике – сериновыми эндопептидазами, такими как трипсин (КФ 3.4.21.4), химотрипсин (КФ 3.4.21.1), эластаза (КФ 3.4.21.71), а также карбоксипептидазы А и В (КФ 3.4.17.1 и 3.4.17.2), аминопептидазы (КФ 3.4.11) и различные пептидазы (КФ 3.4.13). Гидролиз углеводов осуществляют  $\alpha$ -амилаза (КФ 3.2.1.1),  $\gamma$ -амилаза (КФ 3.2.1.3), мальтаза (КФ 3.2.1.20), изомальтаза (КФ 3.2.1.10) и сахараза (КФ 3.2.1.48). Начальные этапы гидролиза липидов реализует липаза (КФ 3.1.1.3), заключительные – эстеразы (КФ 3.1.1.1), эфиры фосфорной кислоты – щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1). Для некоторых специализированных видов рыб характерно наличие хитиназы (КФ 3.2.1.14). У некоторых видов рыб выявлена активность лактазы (КФ 3.2.1.23) и трегалазы (КФ 3.2.1.28), относящихся к группе  $\beta$ -гликозидаз (Уголев, Кузьмина, 1993). Внутриклеточное пищеварение осуществляется при участии ферментов цитозоля (КФ 3.4.13) и лизосом (КФ 3.4.18 – 23), в которых разрушаются все типы химических связей (Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2015).

## **2.1. Соотношение активности одноименных ферментов пищеварительного тракта консументов и их потенциальных объектов питания**

Как известно, обозначение номера классификации не означает идентичность структуры активного центра указанных ферментов таковому млекопитающих, поскольку об их наличии в пищеварительном тракте судят лишь по субстратной специфичности. Важно, что полостное и мембранное пищеварение у рыб и их потенциальных объектов питания реализуют ферменты, близкие именно по субстратной специфичности – пепсин, трипсин, химотрипсин, пептидазы,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -амилаза, мальтаза, сахараза, липаза, эстераза, щелочная и кислая фосфатазы и другие. Для некоторых специализированных видов позвоночных характерно наличие в пищеварительном тракте специфических ферментов, таких как целлюлаза, хитиназа и хитобиаза, часть из которых привносится симбионтами (Fänge, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2015).

Сопоставление активности одноименных ферментов пищеварительного тракта рыб и их потенциальных объектов питания возможно благодаря сходству функциональных характеристик одноименных гидролаз тех и других. Согласно концепции элементарных, или универсальных функциональных блоков, элементарные блоки представляют собой молекулы и надмолекулярные комплексы, способные выполнять различные, в том числе трансформационные функции, реализуемые гидролитическими ферментами (Уголев, 1985; Ивашкин и др., 1990). Анализ имеющейся обширной литературы свидетельствует о том, что видовые различия в уровне активности одноименных гидролаз и их характеристик у рыб и других гидробионтов обусловлены как разным количеством идентичных гидролаз, так и адаптивным изменением их свойств (Кузьмина, 2017).

Поскольку в гидролизе полимеров последовательно участвуют ферменты соответствующих цепей, причем их набор у разных видов консументов, их жертв, энтеральной и ассоциированной с объектами питания микрофлоры может быть различным, целесообразно исследовать активность не отдельных ферментов, а суммарную активность ферментов, гидролизующих тот или иной пищевой

полимер (Кузьмина, 2005, 2015). При этом сопоставление может считаться корректным, если работа проведена в одних и тех же методических условиях. Этим условиям соответствовал цикл исследований, проведенный на гидробионтах Рыбинского водохранилища (Ушакова, Кузьмина, 2010).

В этой работе для выявления соотношения активности одноименных ферментов в пищеварительном тракте консументов и их потенциальных жертв были подробно исследованы рыбы и беспозвоночные, различающиеся по таксономии и экологии. В качестве консументов были изучены 9 видов костных рыб (Черноморско-Каспийская килька *Chupeonella cultriventris*, синец *Ballerus ballerus*, уклейка *Alburnus alburnus*, лещ *Abramis brama*, плотва *Rutilus rutilus*, щука *Esox lucius*, налим *Lota lota*, окунь *Perca fluviatilis*, и судак *Sander lucioperca*), обитающих в Рыбинском водохранилище. В качестве потенциальных объектов питания ихтиофагов была исследована молодь 5 видов рыб: окунь, ерш *Gymnocephalus cernua*, плотва, килька и карп *Cyprinus carpio*, а также суммарная проба мальков рыб сем. Cyprinidae (в основном, плотва, синец, густера *Blicca bjoerkna* и лещ). В качестве потенциальных объектов питания бентофагов использовали беспозвоночных: брюхоногих моллюсков *Limnaea stagnalis* и *Planorbarius purpura*, двустворчатого моллюска дрейссены *Dreissena polymorpha* (тип Mollusca), а также олигохет *Tubifex sp.* и *Lumbriculus sp.* (тип Annelida) и личинок хирономид *Chironomus sp.* и *Ch. riparius* (тип Arthropoda). В качестве потенциальных объектов питания планктофагов использовали представителей ракообразных (тип Arthropoda): *Daphnia pulex*, *D. longispina*, *Chydorus spaericus*, *Chaoborus sp.*, *nauplii* и *copepodids Cyclopoida* и *Calanoida*, *Mesocyclops leukarti*, *Cyclops vicinus* и *Eudiaptomus gracilis*, а также пробы, в которых доминировала *Daphnia longispina*.

При исследовании ихтиофагов максимальная активность пептидаз по гемоглобину слизистой оболочки желудка (рН 3.0), в основном активность пепсиноподобных пептидаз, регистрировалась у типичных ихтиофагов судака и щуки:  $15.7 \pm 0.3$  и  $14.7 \pm 0.2$  мкмоль / (г•мин) соответственно. Уровень активности пепсиноподобных пептидаз у факультативных ихтиофагах (килька, налим и окунь) был приблизительно в два раза ниже, чем у типичных ихтиофагов (рис. 2.1).

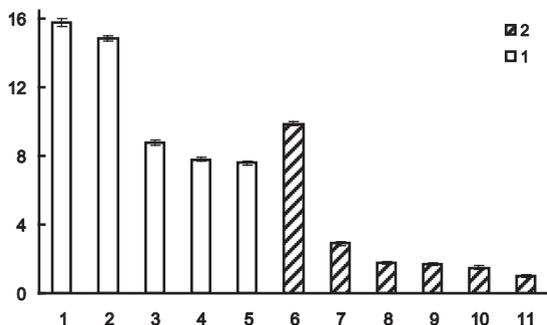


Рис. 2.1. Гемоглобинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки желудка консументов (1-6) и их потенциальных объектов питания (7-11), pH 3,0 (по: Ушакова, Кузьмина., 2010)

По горизонтали: виды животных. 1 – судак *Sander lucioperca*, 2 – щука *Esox lucius*, 3 окунь *Perca fluviatilis*, 4 – килька *Clupeonella cultriventris*, 5 – налимом *Lota lota*, 6 – окунь, 7 – килька, 8 – сеголетки рыб сем. Cyprinidae, 9 – карп *Cyprinus carpio*, 10 – ерш *Gymnocephalus cernua*, 11– плотва *Rutilus rutilus*. По вертикали: ферментативная активность, мкмоль / (г · мин).

Особого внимания заслуживают данные, полученные при исследовании окуня, поскольку у этого вида рыб гемоглобинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки желудка была ниже таковой во всех тканях рыб.

При изучении активности пептидаз слизистой оболочки кишечника были обнаружены значительные видовые различия. Максимальные значения активности казеинлитических пептидаз были выявлены у ихтиофагов (рис. 2.2).

Действительно, максимальный уровень активности пептидаз кишечника по казеину обнаружен у судака:  $15.9 \pm 0.5$  мкмоль / (г · мин), по гемоглобину – у судака и щуки:  $4.9 \pm 0.4$  и  $4.5 \pm 0.03$  мкмоль / (г · мин) соответственно (рис. 2.2). Минимальная казеинлитическая активность выявлена у кильки, гемоглобинлитическая активность – у окуня:  $3.1 \pm 0.1$  и  $1.4 \pm 0.03$  мкмоль / (г · мин) соответственно. При этом активность пептидаз по гемоглобину у всех изученных видов рыб в 1.5–4.7 раза ниже, чем активность пептидаз по казеину. Исключение – ферменты слизистой оболочки кишечника кильки, у которой гемоглобинлитическая активность была несколько выше казеинлитической активности.

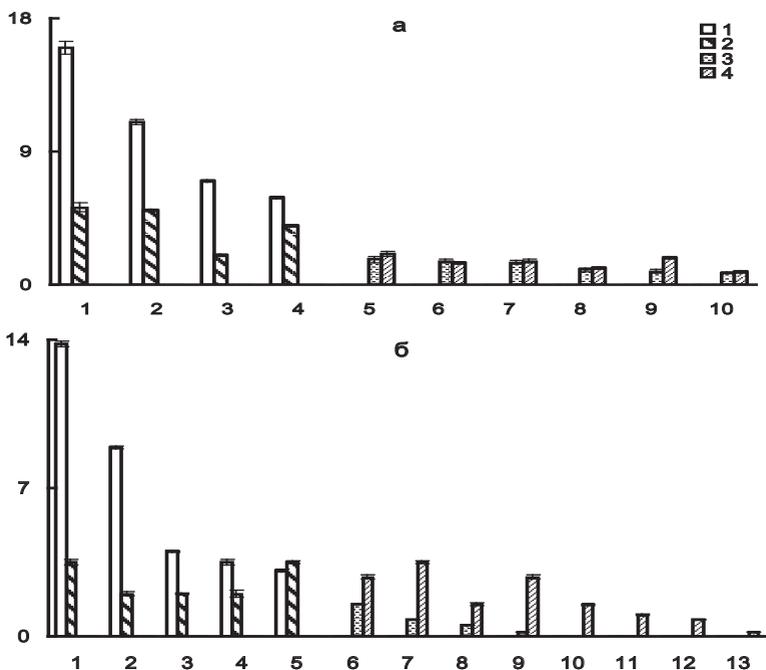


Рис. 2.2. Казеинлитическая и гемоглобинлитическая активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у консументов и их потенциальных объектов питания, рН 7.4 (по: Ушакова, Кузьмина, 2010)

*По горизонтали:* виды животных. На *а*: иктофаги и их потенциальные объекты питания: 1 – судак *Sander lucioperca*, 2 – щука *Esox lucius*, 3 – окунь *Perca fluviatilis*, 4 – налим *Lota lota*, 5 – окунь, 6 – плотва *Rutilus rutilus*, 7 – ерш *Gymnocephalus cernua*, 8 – сеголетки карповых, 9 – килька *Clupeonella cultriventris*, 10 – карп *Cyprinus carpio*. На *б*: планкто- и бентофаги и их потенциальные жертвы: 1 – плотва *Rutilus rutilus*, 2 – уклейка *Alburnus alburnus*, 3 – синец *Ballerus ballerus*, 4 – лещ *Abramis brama*, 5 – килька *Clupeonella cultriventris*, 6 – зоопланктон (общая проба), 7 – *Daphnia longispina*, 8 – Oligochaeta sp., 9 – личинки хирономид *Chironomus* sp., 10 – *Chironomus riparius*, 11 – дрейссена *Dreissena polymorpha*, 12 – прудовик *Limnaea stagnalis*, 13 – планорбарий *Planorbarius purpura*.

*По вертикали:* ферментативная активность, мкмоль / (г · мин). 1 – субстрат казеин, консументы; 2 – субстрат гемоглобин, консументы; 3 – субстрат казеин, потенциальные жертвы; 4 – субстрат гемоглобин, потенциальные жертвы.

В группе типичных планкто- и бентофагов максимальная активность казеинлитических пептидаз была выявлена у плотвы ( $13.6 \pm 0.2$  мкмоль / (г · мин)), причем выявленные значения близ-

ки таковым у типичных ихтиофагов. Эти данные могут указывать на более высокую концентрацию белка в корме плотвы по сравнению с другими видами рыб. Действительно, значительную роль в питании этого вида играют моллюски (Иванова и др., 1978), отличающиеся высокой концентрацией белка, 10–14 % влажной массы (Кузьмина, 2008). Активность гемоглобинлитических пептидаз у всех видов рыб значительно ниже активности казеинлитических пептидаз, причем связь между характером питания рыб и уровнем активности указанных гидролаз отсутствует (Ушакова, Кузьмина, 2010).

Отсутствие четкой связи между типом питания и активностью соответствующих пептидаз у рыб может быть связана с отсутствием различий в количестве белка, потребляемого рыбой, а также в аминокислотном составе белков их потенциальных жертв. Ранее было показано, что увеличение концентрации белка в пище желтохвоста *Seriola quinqueradiata* увеличивает активность трипсина, но не влияет на активность химотрипсина (Kofuji et al., 2005). У лосося *Salmo salar*, в пище которого в течение 90 сут. присутствовал белок, содержащий большое количество аминокислот, содержащих свободные SH-группы, количество трипсина и химотрипсина значительно уменьшалось. Однако соотношение трипсина и химотрипсина увеличивалось по сравнению с таковым у лосося, получавшего пищу с меньшей концентрацией упомянутых выше аминокислот (Sunde et al., 2004).

Особо следует отметить, что при изучении 4-х близкородственных видов рыб увеличение концентрации белка в пище увеличивало скорость экспрессии гена трипсина только у плотоядных видов – *Xiphister atropurpureus* и *Anoplarchus purpureus*. У травоядных видов *Cebidichthys violaceus* и *X. mucosus* такая зависимость не найдена (Gawlicka, Horn, 2006). Определенное влияние на протеолитическую активность может оказывать изменение концентрации в пище таких компонентов, как углеводы и жиры. Так, увеличение концентрации кукурузного крахмала (на 30–50 %) в пище бурого паку *Colossoma macropomum* не оказывает влияния на активность трипсина и химотрипсина, но снижает активность кислых пептидаз (Cogrêa et al., 2007).

Важно отметить, что уровень активности пептидаз во всем организме потенциальных объектов питания рыб в расчете на 1 г влажной массы ткани, как правило, значительно ниже, чем активность

пептидаз слизистой оболочки пищеварительного тракта у рыб. При этом минимальный уровень казеинлитической и гемоглобинлитической активности во всем организме потенциальных жертв характерен для объектов питания бентофагов (моллюсков, олигохет, личинок хирономид). Максимальные значения активности пептидаз обнаружены при исследовании представителей зоопланктона. Также заслуживают внимания различия между активностью пептидаз в зависимости от субстрата в случае слизистой оболочки кишечника консументов и в случае организма их потенциальных жертв.

Действительно, активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у рыб по казеину была выше активности пептидаз по гемоглобину. Во всем организме молоди рыб и беспозвоночных гемоглобинлитическая активность в большинстве случаев была выше казеинлитической активности. Эти данные хорошо согласуются со сведениями о том, что у неполовозрелых роху *Labeo rohita* (Chakrabarti et al., 2006) и пагеля *Pagellus erythrinus* (Suzer et al., 2006), а также у нескольких видов ракообразных (Kumar et al., 2005) и моллюсков (Reid, Rauchert, 1972, 1976), активность химотрипсиноподобных пептидаз выше, чем активность трипсиноподобных пептидаз. Это соотношение у разных видов может несколько варьировать, поскольку уровень активности пептидаз значительно зависит от стадии развития гидробионтов (Jones et al., 1997; Chong et al., 2002; Cuvier-Pères, Kestemont, 2002; Chakrabarti et al., 2006; Suzer et al., 2006).

Особо следует отметить чрезвычайно низкий уровень казеинлитической активности пептидаз у моллюсков. Заслуживает внимания тот факт, что у моллюсков рода *Macoma* (кроме *M. secta*), а также *Tresus sarax*, обитающих в морской воде с разной степенью минерализации, полостной (внеклеточный) гидролиз белков при участии трипсина, имеет меньшее значение, чем внутриклеточное пищеварение (Reid, Rauchert, 1972, 1976). Поскольку у абсолютного большинства видов беспозвоночных регистрировалась активность казеинлитических пептидаз, а изученные виды моллюсков принадлежали к различным систематическим группам (*Bivalvia* и *Gastropoda*), было высказано предположение, что этот феномен возник давно. При этом трипсиноподобные пептидазы играли незначительную роль в процессах пищеварения и в регуляции внутриклеточных процессов уже у общих предков современных моллюсков (Ушакова, Кузьмина, 2010).

## 2.2. Ферменты, обеспечивающие индуцированный аутолиз и симбионтное пищеварение

Отличительной особенностью этих ферментов является то, что они синтезируются вне пищеварительной системы рыб. Индуцированный аутолиз реализуется ферментами лизосом клеток, формирующих большинство тканей жертвы, в первую очередь мышц. Симбионтное пищеварение реализуется ферментами энтеральной микробиоты и частично микрофлоры, ассоциированной с объектами питания рыб.

*Ферменты лизосом.* Относительно высокий уровень пептидаз потенциальных объектов питания рыб может быть обусловлен ферментами, сосредоточенными, главным образом, в лизосомах различных тканей. У всех таксономических групп позвоночных в их состав входят катепсины. Есть сведения о наличии в лизосомах рыб и их потенциальных объектах питания аспартатных пептидаз: катепсинов D (КФ 3.4.22.1) и E (КФ 3.4.23.34), цистеиновых пептидаз: катепсинов B (КФ 3.4.23.34), L (КФ 3.4.22.15) и H (КФ 3.4. 22.16), а также цистеин-карбоксипептидаз: катепсина X (КФ (3.4. 18.1). Хорошо документировано наличие у тех и других лизосомальной кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2).

Так, активность катепсина B обнаружена в икре и тканях у рыб, относящихся к сем. осетровых Acipenseridae, лососевых Salmonidae, карповых Cyprinidae, кефалевых Mugilidae, скумбриевых Scombridae, мерлузовых Merlucciidae, тресковых Gadidae и сельдевых Clupeidae. Активность катепсина D выявлена в икре и у личинок рыб сем. осетровых, лососевых, карповых и кефалевых, катепсина L – у камбаловых Pleuronectidae, лососевых, сельдевых, мерлузовых, карповых и окуневых Percidae. При этом до 90 % активности катепсинов сосредоточено в скелетных мышцах рыб. Из тканей беспозвоночных выделены как ферменты пищеварительного тракта, так и катепсины, близкие по характеристикам таковым рыб. Описаны катепсины A, B, C, D, E и L. У ряда видов ракообразных основным ферментом, расщепляющим белки, является катепсин L, у некоторых креветок и моллюсков основную роль в расщеплении белка играет катепсин B (Кузьмина, 2015).

Как указывалась в первой главе, исследование в идентичных методических условиях активности пищеварительных гидролаз

у трофических партнеров показало, что объекты питания могут вносить существенный вклад в пул гидролаз, разрушающих высокомолекулярные компоненты тканей жертвы в пищеварительном тракте рыб. Действительно, вклад пептидаз жертвы с учетом индуцированного аутолиза может колебаться от 50 до 1000% в зависимости от способа расчета ферментативной активности – на 1 г ткани (Уголев, 1985) или на всю массу жертвы (Кузьмина, 2000, 2005, 2015; Kuz'mina, Golovanova, 2004).

*Ферменты симбионтов.* Ферменты аэробной и облигатной анаэробной микробиоты, осуществляющие симбионтное пищеварение, функционируют преимущественно в нейтральной и щелочной среде кишечника (Уголев, 1985, 1991). При исследовании бактерий слизистой и содержимого кишечника выявлен целый ряд ферментов, аналогичных гидролазам, синтезируемым пищеварительной системой рыб: пептидазы, гликозидазы, липазы, фосфатазы и другие (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Nayak, 2010; Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012; Кузьмина, 2015). Протеолитические бактерии присутствуют практически у всех исследованных видов рыб, амилитические – у рыб, пища которых содержит растительные компоненты. Активность экстрацеллюлярных пептидаз, преимущественно металлосодержащих протеиназ (КФ 3.4.24), обнаружена у бактерий, принадлежащих к р.р. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* и *Enterobacter* (обзоры: Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012; Кузьмина, 2015). Микроорганизмы, обитающие в кишечнике, обычно синтезируют комплекс пептидаз. Так, некоторые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* продуцируют три различных пептидазы: две нейтрально-щелочные и эластазу, аналогичную по функции панкреатической эластазе (КФ 3.4.21.71) (Лубянскене и др., 1989).

При исследовании ряда видов пресноводных рыб показано, что амилазу продуцируют бактерии, принадлежащие к сем. *Bacteroidaceae*, а также к р.р. *Aeromonas* и *Clostridium*, реже – к р. *Pseudomonas*. Из кишечника плотвы *Rutilus rutilus*, уклейки *Alburnus alburnus* и трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* выделены бактерии р.р. *Acinetobacter* и *Pseudomonas/Shewanella*, ферменты которых эффективно разрушают углеводы. У роху *Labeo rohita* помимо указанных выше бактерий выделен 1 штамм, относящийся

к р. *Enterobacter*. У бара *Labeo bata* амилолитические бактерии идентифицированы как *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*, у сома *Mystus gulio* – как *Bacillus licheniformis*. Из кишечника тилапий *Oreochromis mossambicus* и *O. leucostictus*, а также полосатого этроплюса *Etroplus suratensis* выделены бактерии р.р. *Pseudomonas*, *Vibrio* и *Bacillus*, обладающие активностью липазы (Кузьмина, 2015). Помимо этого бактерии продуцируют хитиназу (Уголев, Кузьмина, 1993; Ghosh et al., 2010). Большинство исследованных бактерий принадлежат к сем. *Vibrionaceae* (Sugita, Ito, 2006). Некоторые изоляты р.р. *Vibrio*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter* и *Pseudomonas* помимо хитиназной обладают лецитиназной активностью.

### 2.3. Нутритивные адаптации пищеварительной системы рыб

Проблема адаптации пищеварительной системы животных к составу пищи была поставлена в работах И. П. Павлова (1951). Позднее идея зависимости между составом пищи и уровнем активности ферментов, гидролизующих соответствующие субстраты, была многократно подтверждена при исследовании различных животных, в том числе и рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015). Наиболее подробно исследованы нутритивные адаптации, связанные с изменением активности ферментов в ответ на изменение концентрации соответствующих пищевых субстратов (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Kapoor et al., 1975; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015).

Большинство приведенных в этих обзорах сведений касается генетически закрепленных адаптаций ферментных систем пищеварительного тракта. При этом наиболее хорошо документированы нутритивные адаптации пептидаз и гликозидаз: у ихтиофагов выше активность пептидаз, у фито- и бентофагов – гликозидаз. Для видов с широким спектром питания характерна значительная пластичность ферментных систем. Наиболее ярко выражены адаптации гликозидаз, адаптации пептидаз слизистой оболочки кишечника к характеру питания у тех же видов рыб выражены слабее, щелочной фосфатазы – отсутствуют. Особо следует отметить исключительно высокую генетически закрепленную устойчивость пептидаз, сохра-

няющих высокую активность, несмотря на увеличение в корме рыб (осетр *Acipenser transmontanus*) углеводов и липидов (Buddington, Doroshov, 1986). Есть сведения о зависимости активности пищеварительных ферментов (Трофимова и др., 1975), а также характере проксимо-дистальных градиентов их распределения от диеты и соотношения основных биохимических компонентов (белки, жиры, углеводы), входящих в состав кормов (Щербина, 1980).

Несмотря на то, что в наибольшей степени изменяется активность ферментов, находящихся в начале ферментативной цепи, возможны адаптивные изменения активности ферментов, обеспечивающих промежуточные и заключительные этапы гидролиза нутриентов. При исследовании дипептидаз была доказана возможность тонких, иногда на первый взгляд парадоксальных, адаптаций к составу пищи. Так, уровень активности ферментов, гидролизующих глицил-L-валин, у бентофага леща оказался в 4 раза выше, чем у типичного ихтиофага щуки, что объясняется высоким содержанием валина в белках некоторых объектов питания бентофага (Уголев и др., 1989).

При этом филогенетическая диссоциация ферментов проявляется на всех этапах онтогенеза (Govoni et al. 1986; Ильина, Турецкий, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, Гельман, 1998). Эта закономерность чаще подтверждается при сопоставлении активности одноименных гидролаз у рыб, значительно различающихся по характеру питания. Однако известно и об адаптивном изменении уровня гидролаз у близких по таксономии и экологии видов. Так, на примере ряда видов рыб сем. Cyprinidae, близких по характеру питания (бентофаги), продемонстрированы адаптации ряда карбогидраз ( $\alpha$ -амилаза, сахараза, ферменты группы мальтаз) к биохимическому составу объектов питания (Кузьмина, 1981; Уголев, Кузьмина, 1993; Ugolev, Kuz'mina, 1994). Хорошо известно об адаптациях в пределах одной ферментативной цепи, обусловленных изменением генетически закрепленного спектра питания и биохимического состава пищи рыб. Особенно ярко это было продемонстрировано при исследовании молоди щуки, когда рыб искусственно задерживали на пище, характерной для ранних этапов развития. Опыт показал, что, несмотря на отсутствие в рационе щук рыбной пищи, активность пептидаз возрастала, в то время как активность гликозидаз снижалась (рис. 2.3.). Как показывает рисунок, с возрастом у щуки увеличи-

ваются лишь активность пептидаз. Уровень общей амилолитической активности и активности  $\alpha$ -амилизы резко снижается.

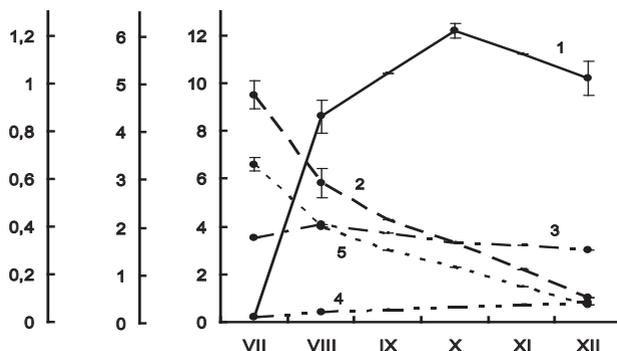


Рис. 2.3. Влияние возраста на активность некоторых ферментов слизистой оболочки кишечника у личинок и мальков щуки (по: Kuz'mina, 1996)

Обозначения: по горизонтали – месяцы года, по вертикали – ферментативная активность, мкмоль/(г•мин) для пептидаз (—), общей амилолитической активности (---), сахаразы (-•-), щелочной фосфатазы (-••-) и мг/(г•мин) для  $\alpha$ -амилизы (---). Левая шкала – сахаразы и щелочная фосфатаза, центральная шкала – общая амилолитическая активность, правая шкала –  $\alpha$ -амилиза и пептидазы.

На примере личинок карпа *Cyprinus carpio* была продемонстрирована этапность в функционировании отдельных ферментов цепи протеаз. Так, на этапе В деградация белковых субстратов осуществляется преимущественно мембранными пептидазами, на этапе  $C_1$  выявляется активность трипсина, на этапе  $D_1$  – химотрипсина.

На первом мальковом этапе (этап Е) наблюдается скачкообразное увеличение активности всех исследованных пептидаз, коррелирующее с изменением спектра питания и увеличением размеров кормовых объектов (Ильина, 1986).

*Нутритивные адаптации потенциальных объектов питания рыб и микрофлоры.* Нутритивные адаптации потенциальных объектов питания рыб, особенно в случае объектов питания итхтиофагов, аналогичны описанным выше.

В случае микрофлоры адаптации достигаются главным образом в результате изменения численности тех или иных бактерий в зависимости от особенностей экологии вида. Так, при исследовании у окуней *Lepomis macrochirus*, значительно различающихся

по типу питания (бентосный, травоядный и планктоноядный), установлены различия кишечной микробиоты. Использование цепной полимеразной реакции (ПЦР) и многомерного дисперсионного анализа позволило выявить существование специфических кишечных бактерий как у бентофагов, так и у планктофагов. Эти результаты позволили предположить, что пищевые приоритеты хозяина могут быть одним из факторов, влияющих на микробиоту кишечника рыб в естественной среде (Kimiko et al., 2006).

Как указывалось в первой главе, почти у всех исследованных видов рыб в кишечнике присутствуют протеолитические и амилолитические бактерии. При исследовании активности внеклеточных пептидаз у бактерий, выделенных из кишечника рыб разных видов, было показано, что они принадлежат к р.р. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* (Ganguly, Prosad, 2012; Ray et al., 2012; Кузьмина, 2015; Кузьмина и др., 2016). Данные, касающиеся активности пептидаз у объектов питания рыб (рыбы и беспозвоночные) и их ассоциированной микрофлоры, свидетельствуют о значительных видовых различиях (табл. 1.1).

Таблица 1.1.

**Активность пептидаз у объектов питания рыб (рыбы и беспозвоночные) и их ассоциированной микрофлоры при температуре 20°C и рН 7.4 (по: Кузьмина и др., 2016)**

<i>Потенциальные объекты питания (беспозвоночные и рыбы)</i>	<i>Активность пептидаз, мкмоль/(г•мин)</i>	
	<i>Объекты питания</i>	<i>Ассоциированная микрофлора</i>
Зоопланктон	6.2±0.2 *	1.50±0.09*
Амфиподы	3.3±0.12 *	2.40±0.13 *
Личинки хирономид	3.1±0.16 *	0.67±0.13
Олигохеты	3.0±0.13	1.20±0.1
Тарань	2.7±0.10	0.87±0.09
Ерш	4.0±0.23 *	1.90±0.11 *
Красноперка	3.4±0.10 *	0.86±0.07
Бычок-песочник	3.2±0.23 *	0.90±0.07

*Примечание.* Здесь и в табл. 2.2: \* P <0.05 согласно F-критерию при сравнении минимальной активности пептидаз и активности пептидаз у других видов (в колонках).

Прежде, чем обсуждать эти данные, важно напомнить, что результаты, полученные для объектов питания рыб сопоставимы с таковыми пищеварительного тракта рыб. Результаты, полученные для ассоциированной микрофлоры, могут сравнивать только между собой из-за того, что определению ферментативной активности предшествовала их культивирование. Среди объектов питания рыб максимальная активность пептидаз выявлена в пробах зоопланктона – основной пищи личинок всех видов рыб. Поскольку активность пептидаз, функционирующих в пищеварительном тракте личинок рыб еще низка, ферменты объектов питания могут компенсировать их низкий уровень, а этот факт может рассматриваться, как возникшая в процессе эволюции адаптация трофических партнеров. На более поздних этапах развития рыб активность пищеварительных гидролаз, как правило, увеличивается, а спектр питания расширяется.

Близкий уровень активности ферментов жертвы позволяет утверждать, что вклад ферментов жертвы в большей степени будет зависеть от ее размера, чем от уровня ферментативной активности тканей. Сопоставление значений активности пептидаз в желудке консументов (щука) и в теле их потенциальных жертв (плотва, окунь) доказало меньшую роль ферментов молоди рыб по сравнению со взрослыми особями (Кузьмина, 2014). Действительно, у взрослых особей активность гемоглобинлитических пептидаз во всей массе тканей жертвы может быть в 5–10 раз выше таковой во всей массе слизистой оболочки их желудка (Кузьмина, 2000; Кузьмина, Скворцова, 2003). В случае молоди рыб это соотношение значительно ниже: 1.5–3.5 (Кузьмина, 2014). В этой же работе показано, что если жертва – сеголетки рыб сем. карповых, то вклад ферментов жертвы в процессы пищеварения консумента значительно меньше. Так, в зависимости от массы консумента и жертвы в случае щук тотальная казеинлитическая активность может составлять 4–10 мкмоль/мин, гемоглобинлитическая активность – 10–25 мкмоль/мин, в случае сеголеток рыб сем. карповых 0.3–0.4 и 0.3–0.5 мкмоль/мин соответственно. Вместе с тем, если щука-консумент поглощала крупную щуку, то тотальная гемоглобинлитическая активность жертвы (140 и 520 мкмоль/мин) могла превышать таковую слизистой желудка в 20–75 раз. Следовательно увеличение размера жертв может иметь большое адаптивное значение, поскольку их ферменты ком-

пенсируют энергетические затраты не только на процессы пищеварения, но и на поимку мелких объектов питания. Активность пептидаз микрофлоры, ассоциированной с объектами питания рыб (рыб и беспозвоночных), как правило, выше у последних. Однако ее реальный вклад в активность жертвы установить невозможно.

Если гетеротрофные и протеолитические бактерии присутствуют практически у всех исследованных видов рыб, то амилолитические появляются только при наличии в рационе рыб пищи растительного происхождения (Шивокене, 1989; Šyvokienė et al., 1996; Шивокене и др., 1996).

Известно, что более 50 % штаммов сем. Bacteroidaceae и р.р. Aeromonas, Pseudomonas и Clostridium производят амилазу (Sugita et al., 1997). Также ферменты бактерий, связанных со слизистой оболочкой рыб, гидролизуют сахарозу (Извекова, 2009). При исследовании лаврака *Dicentrarchus labrax* была выявлена зависимость активности амилазы у представителей р. *Vibrio*, изолированных из кишечника, от состава пищи (Gatesoupe et al., 1997). Однако сопоставление численности протеолитических и амилолитических бактерий у значительно различающихся по характеру питания рыб (ихтиофаги-факультативные бентофаги налим *Lota lota* и окунь *Perca fluviatilis*, бентофаг-факультативный ихтиофаг ерш *Gymnocephalus cernua*, бентофаги уклейка *Alburnus alburnus*, густера, *Blicca bjoerkna* плотва *Rutilus rutilus*, пескарь *Gobio gobio* и трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus*, а также планктофаг корюшка *Osmerus eperlanus*) не всегда позволяет выявить четкую зависимость от типа питания рыб (Voveriene, 2002). При исследовании амилолитической активности микрофлоры, ассоциированной с объектами питания рыб (рыб и беспозвоночных), также не была установлена зависимость от таксономии и экологии вида. Однако была подтверждена большая амилолитическая активность у рыб и бентосных организмов по сравнению с таковой зоопланктона и амфипод, обитающих как в толще воды, так и у дна. Кроме того, у объектов питания рыб и ассоциированной микрофлоры была выявлена большая вариабельность амилолитической активности по сравнению с протеолитической активностью – в 2 и 1.6 раза соответственно (Кузьмина и др., 2016).

*Адаптации специфических ферментов микрофлоры.* То, что наличие в кишечнике макрофитофагов активности целлюла-

зы (Lesel et al., 1986; Das, Tripathy, 1991; Ojeda, Caceres, 1995), а у рыб, потребляющих ракообразных, хитиназы (Colin, Pérès, 1971, Colin, 1972; Fange et al., 1979) является нутритивными адаптациями, не вызывает сомнения. Это подтверждается большей активностью целлюлазы у фундулюса *Fundulus heteroclitus*, обитающего в естественных условиях, по сравнению с рыбами, содержащимися в лабораторных условиях (Moerland, 1985). В пищеварительном тракте циррины белой *Cirrhinus mrigala* выявлена более высокая популяция целлюлолитических бактерий, когда пища содержала ряску, а не рыбную муку (Ghosh, Ray, 2014). Адаптацией к потреблению древесины является наличие в микробном экстракте «древесных» сомов активности ламинариказы, целлюлазы, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы и ксиланазы (German, Bittong, 2009). Есть сведения о том, что бактерии пищеварительного тракта брюхоногого моллюска *Radix peregra* продуцируют хитобиазу (Brendelberger, 1997), а культуры бактерий из кишечника морского зайца *Aplysia californica* способны утилизировать целлюлозу, ксилан и целлобиозу (Kushmaro, 1995). Северный криль *Meganyctiphaunes norvegica* обладает сапрофитными и хитинолитическими микроорганизмами, а также активностью хитиназы, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы, протеазы и ламинариказы (Donachie et al., 1995).

К сожалению, в настоящее время вклад пептидаз микроорганизмов, обеспечивающих симбионтное (симбиотическое) пищеварение, в нутритивные адаптации ферментов, функционирующих в кишечнике рыб, корректно оценить невозможно, поскольку их определению предшествует процедура культивирования микробиоты. Вместе с тем возможно сравнение различных характеристик ферментов энтеральной микробиоты, а также ферментов, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника рыб и химусе.

## 2.4. Заключительные замечания

Прежде всего, важно подчеркнуть существование многочисленных доказательств принципиального сходства структур пищеварительной системы и ферментов, обеспечивающих процессы пищеварения у животных, относящихся к разным таксонам. Анализ имеющихся данных свидетельствует о значительном сходстве

функциональных характеристик ферментов рыб и других позвоночных, а также беспозвоночных и микрофлоры, что в первую очередь обусловлено консервативностью структуры их активного центра (Dixon, Webb, 1964).

В настоящее время нет полного ответа на вопрос о механизмах, лежащих в основе этого сходства. Однако не вызывает сомнения, что успешное функционирование экосистем, базирующееся на существовании трофических сетей, невозможно без структурного сходства пищевых субстратов и гидролаз консументов и их жертв, когда ферменты последних выполняют функцию обратной связи (Уголев, 1985). При этом «потенциальная деструкция должна превосходить актуальную продукцию» (Заварзин, 2011). Необходимость выполнять сходные функции в условиях одних и тех же экосистем не только способствовала синтезу или сохранению гомологичных ферментов у разных организмов, но и привела к выработке сходных механизмов адаптаций у бактерий и рыб, далеко отстоящих друг от друга по филогенетической лестнице (Кузьмина, 2015).

Поскольку рыбы могут рассматриваться и в качестве консументов, и в качестве жертвы, они обладают широким спектром пептидаз. Как указывалось выше, в желудке рыб функционируют аспаргатные эндопептидазы (преимущественно пепсин), в кишечнике – преимущественно сериновые эндопептидазы панкреатического происхождения (трипсин, химотрипсин, эластаза, а также карбоксипептидазы А и В). При этом у многих видов рыб протеолитические ферменты обнаруживаются в первые дни после вылупления личинок. В процессе развития личинок у большинства видов рыб активность пептидаз пищеварительного тракта увеличивается, у фитофагов – снижается. Филогенетическая диссоциация ферментов выявляется на самых ранних этапах онтогенеза – в период перехода рыб на внешнее питание. В пределах цепи протеаз наблюдается последовательность в экспрессии генов отдельных ферментов.

В кишечнике помимо ферментов, синтезируемых пищеварительной системой консумента, присутствуют ферменты жертвы и микрофлоры. У большинства пресноводных рыб преобладают микроорганизмы р.р. *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* и *Clostridium*, реже встречаются

представители р. *Vibrio*. У морских видов рыб чаще доминируют бактерии р.р. *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Clostridium*, *Corinebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium* и *Micrococcus*. У некоторых видов рыб доминируют виды, принадлежащие к классу  $\gamma$ -протеобактерий, в меньшем количестве представлены  $\alpha$ -протеобактерии,  $\beta$ -протеобактерии,  $\epsilon$ -протеобактерии. Из кишечника некоторых видов рыб были выделены молочнокислые бактерии (р.р. *Lactococcus* и *Lactobacillus*). Протеолитической активностью экстрацеллюлярных гидролаз обладают бактерии, принадлежащие к р.р. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* и *Enterobacter*. Видовой и количественный состав микрофлоры кишечника может изменяться в зависимости от солености воды у рыб одного и того же вида: с увеличением солености воды уменьшается количество облигатных анаэробов и возрастает содержание аэробных и факультативно анаэробных грамотрицательных палочек. При этом для планкто- и бентофагов характерно большее видовое разнообразие энтеральной микробиоты, обеспечивающей симбионтное пищеварение, чем у ихтиофагов.

Важную роль в функционировании отдельных особей и биоцинозов играют нутритивные адаптации пищеварительных гидролаз, связанные с изменением активности ферментов в ответ на изменение концентрации соответствующих пищевых субстратов консументов, их потенциальных объектов питания и микробиоты. Большинство сведений касается генетически закрепленных адаптаций ферментных систем пищеварительного тракта консументов, в частности, большей активности пептидаз у зоофагов, особенно у типичных ихтиофагов, гликозидаз – у макрофитофагов и бентофагов. Возрастные изменения ферментативной активности, как правило, обусловлены изменением спектра питания. Соотношение активности различных пептидаз пищеварительного тракта у разных видов рыб может варьировать. При этом активность пептидаз и гликозидаз у представителей одной экологической группы может быть достаточно близкой в случае, если спектр питания близок, или различаться, если спектр питания различен (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005).

Одной из форм нутритивных адаптаций можно считать механизм индуцированного аутолиза, в реализации которого главную

роль играют лизосомальные гидролазы тканей жертвы, наиболее эффективно функционирующие в зоне кислых значений pH. Вследствие этого наибольшее значение этот тип адаптаций имеет у желудочных рыб, обладающих пепсино-кислым пищеварением. Нутритивные адаптации ферментов микробиоты, осуществляющих симбионтное пищеварение и функционирующих в нейтральной и щелочной среде кишечника, напротив, характерны для всех животных. Однако из-за ряда методических трудностей их вклад в процессы пищеварения рыб до сих пор не установлен. Вместе с тем, как будет показано в четвертой главе, пептидазы энтеральной микробиоты, а также микробиоты, ассоциированной с потенциальными жертвами рыб имеют более широкий спектр оптимумов pH (5–10) по сравнению с сериновыми пептидазами, синтезируемыми пищеварительной системой рыб (9–11). Особое значение имеют пептидазы молочнокислых бактерий, активные при кислых значениях pH, когда активность пептидаз, синтезируемых пищеварительной системой рыб, низка. Компенсаторная роль пептидаз молочнокислых бактерий особенно важна для безжелудочных рыб, не обладающих пепсино-кислым пищеварением, что является адаптацией, позволяющей ферментам пищеварительного тракта рыб функционировать в широком диапазоне значений pH.

Таким образом, существует значительное сходство ферментов рыб, беспозвоночных и микрофлоры, что в первую очередь обусловлено консервативностью структуры их активного центра. Соотношение активности одноименных ферментов у тех и других в значительной мере зависит от спектра питания рыб. Нутритивные адаптации ферментов реализуются не только за счет гидролаз консументов, но и за счет ферментов их объектов питания, осуществляющих индуцированный аутолиз, а также гидролаз ассоциированной и энтеральной микробиоты, реализующей симбионтное пищеварение.

### **Глава 3. Влияние температуры на активность и характеристики пищеварительных ферментов рыб, их потенциальных объектов питания, энтеральной и ассоциированной микрофлоры**

Необходимость исследования влияния температуры на активность пищеварительных ферментов рыб связана с зависимостью скорости их физиологических и биохимических процессов от температуры окружающей среды (Hochachka, Somero, 1971, 1973, 2002; Hazel, Prosser, 1974; Shulman, Love, 1999; Уголев Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005, 2015, Gelman et al., 1992, 1993, 2008; Lloret et al., 2014; Somero et al., 2017). Как известно, исследование влияния температуры на активность пищеварительных ферментов рыб началось конца XIX в., когда было обнаружено, что протеолитические ферменты желудка щуки *Esox lucius* могут функционировать при температуре, близкой к 0°C (Fick, Murisier, 1873). Позднее этот факт неоднократно подтверждался при исследовании разных видов рыб (Коштоянц, 1950; Buddenbrock, 1956; Ugolev et al., 1983; Кузьмина, 1985, 2005, 2015; Уголев, Кузьмина, 1993; Пономарев, 1993; Kolodziejska, Sikorski, 1996; Kuz'mina, Gelman, 1997; Gelman et al., 2008). Важно, что еще в середине XX века было показано, что оптимальная температура одноименных ферментов рыб при одинаковом времени инкубации ферментативно активных препаратов и субстратов обычно смещается в зону более низких температур по сравнению с теплокровными животными (Коржуев, 1036; Коштоянц, 1950).

В последней трети XX в. были детально изучены ферменты, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у рыб разных таксономических и экологических групп. Особое внимание было уделено ферментам, реализующим гидролиз углеводов (Кузьмина, 1977; Уголев, Кузьмина, 1993) и эфиров фосфорной кислоты (Уголев и др., 1981; Ugolev et al., 1983; Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 1984, 1992, 1993, 2008). В настоящее время значительное внимание уделяется температурным характеристикам потенциальных объектов питания рыб, обеспечивающих индуцированный аутолиз и кишечной микрофлоры, реализующей симбионтное (симбиотическое) пищеварение.

### 3.1. Влияние сезона на активность пищеварительных ферментов рыб

Сезонные изменения температуры воды являются одним из наиболее важных факторов окружающей среды, существенно влияющие на активность пищеварительных ферментов. При этом активность ферментов зависит не только от скорости их синтеза, но и от прямого влияния температуры на состояние активного центра ферментов. Наиболее подробно сезонная динамика активности пищеварительных ферментов описана на примере гидролаз, реализующих мембранное пищеварение у костистых рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Показано, что максимальный уровень активности ферментов у бореальных рыб обычно наблюдался летом при температуре 20–24°C. Однако в ряде случаев максимальный уровень амилолитической активности у бореальных рыб отмечался зимой, когда экзогенное питание было исключено или ослаблено (Ананьев, 1959; Уголев, Кузьмина, 1993). Наиболее значительная сезонная вариабельность активности ферментов была выявлена при изучении  $\alpha$ -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов у леща *Abramis brama*: 10 – 15 мг / (г • мин) в весенний и осенний периоды, а также 60–80 мг/(г • мин) летом, во время наиболее интенсивного питания (Кузьмина, 1980).

Наиболее подробно сезонная динамика различных гидролаз изучена на примере налима *Lota lota*, щуки *Esox lucius*, леща *Abramis brama* и плотвы *Rutilus rutilus* (Кузьмина, 1988). Важно, что в этой работе инкубация субстратов и ферментативно активных препаратов проводилась при температуре 20°C и при температуре, близкой к температуре окружающей среды (зима – около 0°C, весна и осень – 10°C, лето – 20°C). Данные, касающиеся сезонной динамики общей амилолитической активности у щуки, леща и плотвы свидетельствуют о зависимости от условий эксперимента (рис. 3.1).

Как показывает рисунок, при стандартной температуре инкубации 20°C зимой ферментативная активность была ниже, чем летом у щуки в 4.8, у леща – в 1.4, у плотвы – в 2.9 раза. Определения, проведенные при температуре, близкой к естественной, позволили выявить более значительные сезонные различия в уровне общей амилолитической активности. Оказалось, что зимой активность

ферментов ниже, чем летом у щуки в 12.9, у леща – в 6.2 у плотвы – в 25.7 раза.

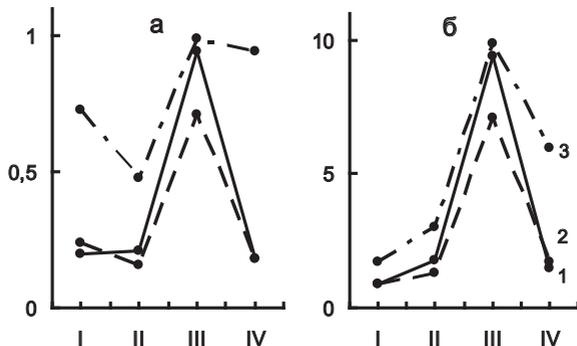


Рис. 3.1. Сезонная динамика общей амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у некоторых видов рыб (по: Кузьмина, 1988)

По горизонтали: сезоны года: I – зима, II – весна, III – лето, IV – осень.

По вертикали: уровень ферментативной активности, ммоль / (г • мин). а – температура инкубации 20°C, б – температура инкубации, близкая к температуре окружающей среды (зима – около 0°C, весна и осень – 10°C, лето – 20°C). 1 – щука, 2 – плотва, – лещ, 1 и 3 – левая шкала, 2 – правая шкала.

Сезонная динамика активности собственно мембранного фермента – сахаразы, измеренная у разных видов рыб в тех же условиях, также была различной (рис. 3 2).

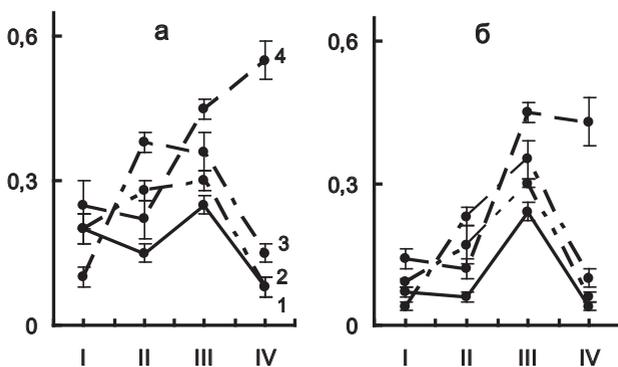


Рис. 3.2. Сезонная динамика активности сахаразы у некоторых видов рыб (по: Кузьмина, 1988).

Обозначения, как на рисунке 3.1. 1 – щука, 2 – лещ, 3 – плотва, 4 – налим

Прежде всего, важно отметить, что у щуки значительные различия в активности сахаразы в течение зимы и весны не отмечались, а максимальная активность фермента у налима при 20°C наблюдались в осенний период (минимальные весной). Сезонная динамика активности сахаразы у леща и плотвы близка таковой амилолитической активности. При этом максимальные значения превышают минимальные у щуки в 1.3, у леща – в 5.6, у плотвы в 2.9, у налима – в 7.8 раза. При температуре инкубации, близкой к природной, сезонная динамика активности сахаразы у всех видов, кроме налима, выражена отчетливо. Это связано с тем, что наиболее интенсивно налим питается в конце осеннего периода.

*Активность щелочной фосфатазы.* Сезонная динамика активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника изучалась у тех же видов рыб (рис. 3.3).

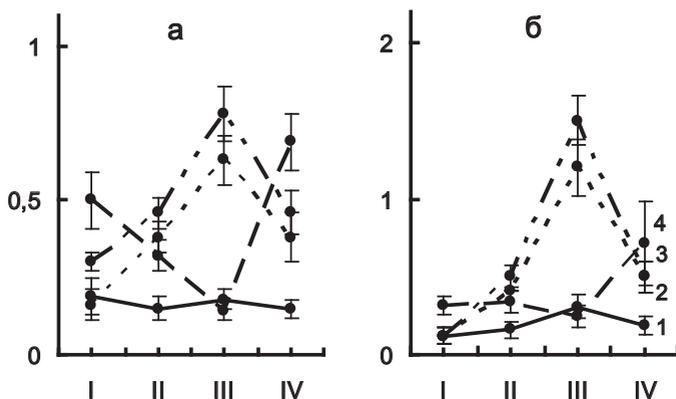


Рис. 3.3. Сезонная динамика активности щелочной фосфатазы у некоторых видов рыб (по: Кузьмина, 1988)

Обозначения, как на рисунке 3.1.: 1 – щука, 2 – лещ, 3 – плотва, 4 – налим.

Как показывает рисунок, у щуки в обоих случаях активность фосфатазы на протяжении годового цикла слабо варьирует, у бентофагов плотвы и леща наблюдается отчетливый максимум в летний период. Только для налима отмечены различия в характере сезонной динамики активности щелочной фосфатазы при стандартной температуре 20°C и при температуре среды обитания. Сравнение летних и зимних определений показывает, что у щуки активность

щелочной фосфатазы снижается в 3.6 раза, у налима, леща и плотвы – в 4.2, 11.8 и 5.2 раза соответственно. Следовательно, сезонная динамика активности пищеварительных гидролаз у рыб разных видов различна и в значительной степени зависит от особенностей их питания и температуры инкубации среды.

Позднее при исследовании влияния сезона на активность ряда гликозидаз слизистой оболочки кишечника у шести видов пресноводных костистых рыб эти результаты были подтверждены. При этом показана значительная корреляция между уровнем общей амилитической и сахаразной активности слизистой оболочки кишечника и содержанием углеводов в пище, а также с интенсивностью питания рыб (Kuz'mina et al., 1996). Сезонная динамика пептидаз, обеспечивающих гидролиз белков у разных видов рыб различна. Для бенто- и планктофагов леща, плотвы и синца характерна более высокая казеин- и гемоглобинлитическая активность в летний период. Для ихтиофагов четкая зависимость активности пептидаз от сезона не выявлена, что связано с нерегулярностью питания.

Важно подчеркнуть, что на активность ферментов влияют как температура окружающей среды, так и температура инкубации. Максимальная активность при температуре, близкой к температуре окружающей среды, наблюдается в период наиболее интенсивного питания рыб. Эти наблюдения близки результатам, полученным другими авторами как для гликозидаз (Hofer, 1979a, Пономарев, 1993; Kuz'mina et al., 1996), так для пептидаз (Hofer, 1979b, Пономарев, 1993) и щелочной фосфатазы (Gelman et al., 1984, 2008). У некоторых рыб Европейского Севера уровень протеолитической, амилитической активности и активности сахаразы, измеренный при 20°C, был близок зимой и летом. Однако у голяна *Phoxinus phoxinus* и молоди лосося *Salmo salar* активность  $\alpha$ -амилазы, измеренная при температуре, близкой к температуре окружающей среды, летом была ниже (10°C), чем зимой (около 0°C) (Пономарев, 1993).

Также следует обратить внимание на увеличение амилитической активности при 20°C зимой у леща и плотвы, не питающихся в этот период. Ранее этот факт был отмечен Ананичевым (1959). По всей вероятности, это связано с накоплением фермента, синтезируемого поджелудочной железой, на структурах слизистой оболочки в процессе рециклинга и является заключительной фазой эндо-

трофии. Наличие сезонной динамики у бореальных рыб характерно и для мембранных ферментов. При этом у типичного ихтиофага щуки, питающегося на протяжении всего годового цикла, сезонные изменения активности сахаразы и щелочной фосфатазы выражены слабее, чем у бентофагов, прекращающих питаться при температуре ниже 7°C и переходящих на эндогенное питание. У ихтиофага-факультативного бентофага налима, наиболее интенсивно питающегося в осенне-зимний период, максимальная активность сахаразы и щелочной фосфатазы отмечена осенью. Эти данные свидетельствуют о значительной взаимосвязи между интенсивностью синтеза ферментов, функционирующих на структурах слизистой оболочки кишечника рыб и особенностями их экологии, в том числе типом и интенсивностью питания.

Наконец, следует обратить внимание на значительное влияние температуры инкубации на результаты, а также важность одновременного определения ферментативной активности при стандартной температуре и температуре, близкой к природной. Наблюдаемые различия могут объясняться не только различиями в скорости синтеза и деградации ферментов, но и различными их характеристиками (температурная зависимость, энергия активации, максимальная скорость реакции, кажущаяся константа Михаэлиса и другие) у рыб, принадлежащих к разным экологическим группам (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005; Gelman et al., 2008).

### **3.2. Особенности влияния температуры на активность ферментов слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофлоры у разных видов рыб**

Как известно, температура тела большинства видов рыб соответствует температуре окружающей среды, которая колеблется от -1.5 до 50°C. Пищеварительная система рыб эффективно функционирует в широком диапазоне температур (Уголев, Кузьмина, 1993, Gelman et al., 2008). Есть сведения о генетически закрепленных характеристиках, а также о характеристиках, которые могут быстро изменяться (Егорова и др., 1974; Уголев и др., 1986; Кузьмина, 1985, 1990; Gelman et al., 1993, 2008; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina,

Gelman, 1997). У бореальных видов температура влияет на характеристики пищеварительных гидролаз ихтиофагов в меньшей степени по сравнению с таковыми планкто- и бентофагов (Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008). Наибольшие различия были выявлены при изучении влияния температуры на активность ферментов, находящихся в начале ферментативной цепи:  $\alpha$ -амилаза в цепи гликозидаз и пепсина в цепи пептидаз (Кузьмина, 1985, 1990). В настоящее время значительное внимания уделяется температурным характеристикам ферментов потенциальных объектов питания рыб, обеспечивающих индуцированный аутолиз, и энтеральной микробиоты, реализующей симбионтное (симбиотическое) пищеварение.

### **3.2.1. Влияние температуры на активность и характеристики ферментов слизистой оболочки рыб**

Хорошо известно, что температурный оптимум одноименных ферментов пищеварительного тракта рыб при одинаковых условиях инкубации ферментативно активных препаратов и субстратов обычно смещается в сторону более низких температур по сравнению с теплокровными животными (Коштойац, 1950, Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015; Gelman et al., 2008). При этом характеристики ферментов (термостабильность, температурная зависимость и энергия активации), функционирующих в начале ферментативной цепи, и участвующие в начальных стадиях деградации полисахарида ( $\alpha$ -амилаза) и белков (пепсин), значительно отличаются от ферментов, которые реализующих промежуточный и заключительные стадии гидролиза (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993, Kuz'mina, Gelman, 1997; Gelman et al., 2008).

*Характеристики гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб.* Температурный оптимум  $\alpha$ -амилазы у рыб разных видов варьирует в узком диапазоне – 35–45°C (Munilla-Moran, Saborido-Rey, 1996; Hidalgo et al., 1999; De la Parra et al., 2007). При исследовании рыб из Рыбинского водохранилища было показано, что температурный оптимум  $\alpha$ -амилазы, обеспечивающий начальные стадии гидролиза полисахарида крахмала, зависит от типа питания рыб, причем у ихтиофагов ниже (30°C), чем у планкто- и бентофагов (40°C). Относительная активность  $\alpha$ -амилазы в зоне низких тем-

ператур в первом случае составляет от 50 до 70%, во втором – не превышает 15 % от максимальной активности (рис. 3.4 а).

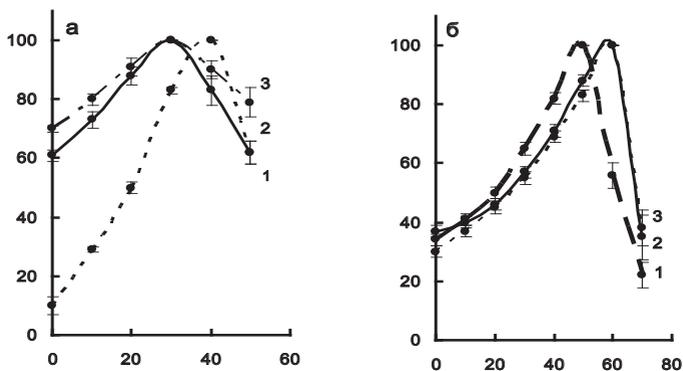


Рис. 3.4. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -амилазы (а) и ферментов группы мальтаз (б) у некоторых видов рыб (по: Уголев, Кузьмина, 1993)  
Обозначения: по оси абсцисс температура, °С. По оси ординат: ферментативная активность, % от максимума, принятого за 100. На а: 1 – чехонь, 2 – лещ, 3 судак, на б: 1 – налим, 2 – щука, 3 – лещ.

Необходимо отметить, что на рисунках показаны только три кривые. Однако данные, приведенные для леща, характерны для всех планкто- и бентофагов, а данные, приведенные для судака, характерны и для щуки. Обращает на себя внимание, что максимальная активность  $\alpha$ -амилазы у ихтиофагов выше минимальной активности примерно в 2 раза, у планкто- и бентофагов – в 5 раз и более. У чехони *Pelecus cultratus* – представителя сем. карповых Cyprinidae, близкого по таксономии к планкто- и бентофагам, форма кривой температурной зависимости  $\alpha$ -амилазы близка таковой ихтиофагов. Это связано тем, что чехонь по типу питания относится к группе ихтиофагов-факультативных планктофагов (Поддубный, 1971).

Форма кривой температурной зависимости ферментов группы мальтаз у рыб разных видов имеет значительное сходство. Значение температурного оптимума ферментов соответствует 60°C. Относительная активность фермента при 0°C находится в диапазоне 30–40 % от максимальной активности. Однако значение температурного оптимума у налима ниже (50°C). Более низкие значения температурного оптимума и, следовательно, термостабильность

мальтазы у налима, по всей вероятности, связаны с его арктическим происхождением (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993).

При определении величин энергии активации ( $E_{\text{акт}}$ ) этих ферментов в ряде случаев был обнаружен излом на графиках Аррениуса (Уголев, Кузьмина, 1993). Так, наименьшие значения  $E_{\text{акт}}$   $\alpha$ -амилазы в зоне низких температур были зафиксированы при исследовании ихтиофагов, способных питаться при температурах, близких к  $0^{\circ}\text{C}$  (у ихтиофагов – 2.6–4.7, у планкто- и бентофагов – 8.8–11.5 ккал/моль). Следовательно, эффективность гидролиза полисахарида ферментами ихтиофагов в среднем в 2 раза выше, чем у рыб других экологических групп (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). Значения  $E_{\text{акт}}$  мальтазы в зоне низких и высоких температур у всех видов рыб значительно ниже, чем у  $\alpha$ -амилазы. У бентофагов значения  $E_{\text{акт}}$  варьируют от 3.1 ккал/моль до 4.0 ккал/моль. Для ихтиофагов характерен излом на графике Аррениуса (у щуки и окуня при  $20^{\circ}\text{C}$ , у налима – при  $10^{\circ}\text{C}$ ). При этом значения  $E_{\text{акт}}$  в зоне низких температур близки у всех видов рыб (1.9–2.2 ккал/моль), при высокой температуре они различны (у щуки 3.6, у налима и окуня – 4.1 и 4.6 ккал/моль соответственно). Следовательно, эффективность гидролиза полисахарида ферментами ихтиофагов в среднем в 2 раза выше, чем у рыб других экологических групп (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993).

Исследование влияния температуры на общую амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника у девяти видов рыб, различающихся по типу питания и обитающих в водоемах с разной термикой, не позволило обнаружить значительные различия характеристик фермента (Kuz'mina et al., 2003; Gelman et al., 2008). Температурный оптимум ферментов составляет  $60^{\circ}\text{C}$  для всех видов бентофагов. При  $0^{\circ}\text{C}$  активность ферментов у леща, плотвы и карпа составляет 8.0, 7.6 и 5 % от максимальной активности соответственно. Температурный оптимум ферментов щуки и окуня соответствует таковому бентофагов ( $60^{\circ}\text{C}$ ), налима –  $50^{\circ}\text{C}$ . При  $0^{\circ}\text{C}$  ферментативная активность у щуки, налима и окуня составляла 10.8 и 6 % от максимальной активности соответственно (Kuz'mina et al., 2003). У тропических и субтропических видов при  $0^{\circ}\text{C}$  относительная активность ферментов была ниже: у сардинеллы и сардины-пильчард они составляли 3 %, у макрели до 1 % максимальной активности при  $60^{\circ}\text{C}$  (Gelman et al., 2008).

Однако величины  $E_{акт}$  общей амилолитической активности различаются у разных видов рыб. Точки излома в графиках Аррениуса характерны для ферментов всех видов рыб, но температура точки перелома и значения  $E_{акт}$  различаются у рыб разных видов. Так, у щуки в диапазоне 0–10°C  $E_{акт}$  составляет 3.8 ккал/моль, в зоне более высоких температур – 8.2 ккал/моль. У бентофагов (каarp, плотва и лещ), напротив, в диапазоне 0–20°C значения  $E_{акт}$  выше 14,3, 14,1 и 9,8 ккал/моль соответственно, чем в зоне 20–40°C – 5.7, 5.2 и 6.9 кка/моль соответственно (Kuz'mina et al., 2003; Gelman et al., 2008).

*Характеристики пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб.* Температурные характеристики казеинлитических пептидаз бореальных рыб, сходны с таковыми гликозидаз планкто- и бентофагов. Однако активность гемоглобинлитических (пепсиноподобных) пептидаз слизистой оболочки желудка у рыб, питающихся зимой, при низких температурах выше, чем у рыб, не питающихся в зимний период. Относительная активность ферментов в зоне 0–10°C у первых составляет 70–80 %, у вторых – 10–15 % от максимальной активности соответственно (рис. 3.5).

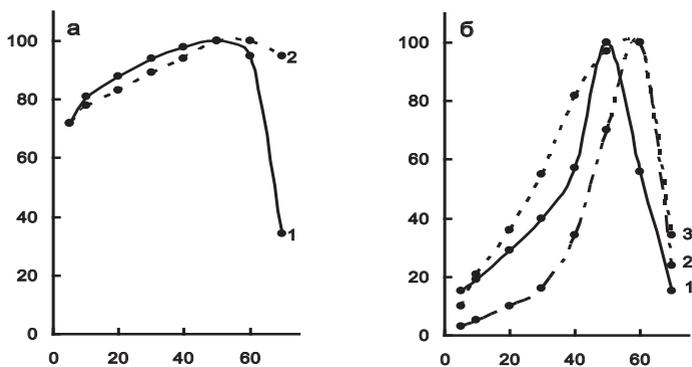


Рис. 3.5. Влияние температуры на казеинлитическую активность пептидаз слизистой оболочки желудка (а) и слизистой оболочки кишечника (б) у некоторых видов рыб (по: Кузьмина, 1990)

Обозначения, как на рис 3.4. а: 1 – налим, 2 – щука, б: 1 – налим, 2 – лещ, 3 – щука.

Неожиданные результаты были получены при исследовании температурной зависимости казеин- и гемоглобинлитических

пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони *Pelecus cultratus*. Несмотря на разный уровень ферментативной активности, выявлено удивительное сходство в форме их кривых. В обоих случаях температурный оптимум пептидаз соответствует 60°C. Кроме того, отмечена очень высокая относительная активность исследованных пептидаз во всем диапазоне исследованных температур, причем активность фактически не изменялась в интервале 10–60°C. Относительная активность при 0°C в случае казеинлитических пептидаз составляет 92.6 %, гемоглобинлитических – 77 % от максимальной активности (рис. 3.6).

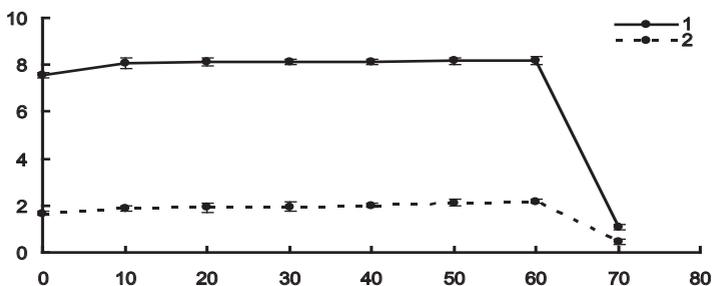


Рис. 3.6. Влияние температуры на активность казеинлитических (1) и гемоглобинлитических (2) пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони (по: Кузьмина и др., 2017 в)

Обозначения, как на рис 3.4.

Поскольку данные, касающиеся температурной зависимости пептидаз чехони, были получены при исследовании рыб ( $n = 8$ ) из одного сетного улова, а на следующий год эти данные не подтвердились, необходимо дополнительно исследовать этот феномен.

Вместе с тем в абсолютном большинстве случаев характеристики кишечных пептидаз сходны с характеристиками, описанными ранее для других видов рыб. Так, у холодноводной трески *Gadus morhua* максимальная амидазная и эстеразная активность трипсина наблюдается при 55°C (Ásgeirsson et al., 1989). Температурный оптимум трипсина по бензоил-DL-аргинин-*n*-нитроанилиду, характеризующий амидазную активность у представителей сем. сельдевых *Brevoortia* spp. и сем. кефалевых *Mugil* spp. также соответствуют 55°C (Pavlisko et al., 1999). Максимум общей протеолитической

активности и активности трипсина у тунца *Thunnus orientalis* составляет 60°C (De la Parra et al., 2007). У тамбуку *Colossoma macroporum* (Bezerra et al., 2001), скумбрии *Scomber australasicus* (Kishimura et al., 2006) и горбыля *Micropogonias furnieri* (Pavlisko et al., 1997a) температурный оптимум амидазной активности трипсина соответствует 60°C, у пароны *Parona signata* соответствует ~ 65°C (Pavlisko et al., 1997b).

Однако у атлантической сельди *Clupea harengus* максимальная активность была выявлена в температурном диапазоне 40–50°C (Kalać, 1978), а у гибрида *Tilapia nilotica* × *T. aurea* она соответствует ~ 40°C (El-Shemy, 1997). Поскольку атлантическая сельдь обитает при температуре не выше 18°C, а гибрид тилапии – при температуре 30 – 33°C, этот факт может указывать на независимость этого параметра от температуры окружающей среды. При исследовании пресноводных костистых рыб, обитающих в бореальной зоне, но принадлежащих к разным фаунистическим комплексам, были выявлены различия в величине температурного оптимального казеинлитических пептидаз. У налима, принадлежащего к арктическому фаунистическому комплексу, температурный оптимум находится при 50°C, у видов, принадлежащих к понто-каспийскому и бореально-равнинному фаунистическим комплексам – при 60°C. «Максимальная» активность химотрипсина у тунца *Thunnus orientalis* наблюдается в широком диапазоне температур (25–60°C), с тенденцией к снижению при 65°C. Важно, что относительная активность химотрипсина (60 % максимальной активности) лежит в температурном диапазоне его жизнедеятельности, а именно при температуре 15 – 25°C (De la Parra et al., 2007).

Величины  $E_{\text{акт}}$  пептидаз слизистой оболочки желудка колеблются в узком диапазоне: 2.2–2.6 ккал/моль (Кузьмина, 1990, Уголев, Кузьмина, 1993). Значения  $E_{\text{акт}}$  пептидаз кишечника и химуса кильки *Clupeonella cultriventris* в диапазоне 10–30°C находятся в пределах 1.8–6.9 ккал/моль, гибрида *Tilapia nilotica* × *T. aurea* – в диапазоне 20–30°C – 8.9 (El-Shemy, 1997). У атлантической трески *Gadus morhua*  $E_{\text{акт}}$  гидролиза синтетических субстратов (метилловый эфир тозил-аргинин и бензоил-аргинин нитроанилид) составляет соответственно 7.6 и 9.0 ккал/моль (Ásgeirsson et al., 1989).

*Характеристики глицил-L-лейцин дипептидазы слизистой оболочки кишечника рыб.* Как известно, дипептидазы отвечают за конечные стадии переваривания белка (Егорова и др., 1974; Ash, 1980; Wyban, 1982; Aranishi et al., 1997 a, b; Gelman et al., 2003). Показано, что температурный оптимум глицил-L-лейцин дипептидазы у круглоротого бычка *Neogobius melanostomus* и радужной форели *Salmo gairdneri* находится при 30°C. Однако относительная активность ферментов при температуре 0°C у термофильных бычков оказалась ниже, чем у холодолюбивой форели: 7 и 20 % от максимальной активности соответственно (Егорова и др., 1974). Температурные характеристики глицил-L-лейцин дипептидазы слизистой оболочки кишечника у рыб бореальной зоны наиболее подробно изучены на примере судака *Sander lucioperca* и леща *Abramis brama* из Куршского залива Балтийского моря (Gelman et al., 2003).

Летом величина температурного оптимума глицил-L-лейцин дипептидазы у судака была на 10°C выше, чем зимой (40 и 30°C, соответственно). У леща, как летом, так и зимой, величина температурного оптимума составляла 30°C. При этом максимальная активность глицил-L-лейцин-дипептидазы у судака летом была в 20 раз выше, чем зимой, а уровень относительной активности при 0°C в эти сезоны составлял 3 % и 16,4 % от максимальной активности соответственно. У леща летом относительная активность при 0°C составляла 2 %, зимой – 11,5 % от максимальной активности (Gelman et al., 2003). Следовательно, температурный оптимум дипептидаз, в частности глицил-L-лейцин дипептидазы, реализующий заключительные этапы гидролиза белковых компонентов корма (30–40°C) ниже, чем у пептидаз, синтезируемых поджелудочной железой и реализующих начальные этапы гидролиза белка (50–60°C). При исследовании лейцинаминопептидазы у тунца *Thunnus orientalis* показано, что величина температурного оптимума зависит от локализации фермента. В проксимальной части кишечника температурный оптимум фермента находится при 45°C, в медиальной и дистальной частях кишечника – при 60°C (De la Parra et al., 2007).

*Характеристики щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб.* Исследование температурной зависимости щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника у разных видов костистых рыб показало, что температурный оптимум ферментов

наблюдается при 40 или 50°C. При этом температурный оптимум щелочной фосфатазы у плотвы из Рыбинского водохранилища, независимо от сезона, может быть обнаружен при обеих температурах (Уголев, Кузьмина, 1993). Однако при изучении температурной зависимости щелочной фосфатазы у хрящевых рыб, обитающих в Черном море, было показано, что у ската *Raja clavata* температурный оптимум находится при 50°C, у акулы *Squalus acanthias* в зоне – 30–50°C. В зоне температур жизнедеятельности диапазоны активности ферментов у первых составляет от 12.2 до 38.9 %, у вторых – от 46.1 до 83.7 % от максимальной активности. Последнее может быть связано с адаптацией к жизни в широком диапазоне ареала. Действительно, акулы этого вида встречается не только на юге, но и в северных морях (Кузьмина, 2005).

У тропических и субтропических рыб термостабильность фермента выше. В частности, кривая температурной зависимости щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника у ставриды *Trachurus symmetricus* и сардины *Sardina pilchardus* похожи, причем обоих видов оптимум температуры соответствует 50°C, тогда как у ставриды – 60°C. Относительная активность ферментов у всех трех видов при низких температурах не превышает 3–5 % от максимальной активности. Важно, что фермент тропической ставриды обладает значительно более высокой термостабильностью, чем фермент двух других видов (Gelman et al., 2008).

### **3.2.2. Влияние температуры на активность и характеристики ферментов потенциальных объектов питания рыб**

Как подчеркивалось в первой главе, в последние десятилетия значительное внимание уделяется исследованию роли ферментов жертвы в процессах пищеварения рыб (Dabrowski, Glogowski, 1977a, b; Dabrowski, 1979; Кузьмина, 1990a, 2005, 2015; Oozeki, Bailey, 1995). Благодаря разработке принципиально новых методологических подходов к оценке роли ферментов жертвы в пищеварении консументов (Кузьмина, 2000, Кузьмина и др., 2003) было показано, что пептидазы жертвы могут в значительной степени способствовать гидролизу белковых и углеводных компонентов в желудке рыб (Кузьмина, 2000,

Кузьмина, Скворцова, 2003; Kuz'mina, Golovanova, 2004). При этом значительная роль на начальных стадиях деградации пищевых субстратов принадлежит механизму индуцированного аутолиза.

Поскольку считается, что в кишечнике доминирует нейтральная или слабощелочная среда, важно отметить, что в его проксимальном отделе значения pH могут быть ниже 7 (Barrington, 1957; Кузьмина, Неваленный, 1983; Соловьев и др., 2015; Solovyev et al., 2017). На ранних стадиях переваривания пищи pH химуса у рыб может соответствовать pH 6.2–6.5 (Deguara et al., 2003). Кроме того, в проксимальном отделе кишечника желудочный сок контактирует с панкреатическим соком. В результате при pH 3.5–5.1 образуются флоккулы, содержащие субстраты и ферменты, которые могут взаимодействовать при этих значениях pH (Гальперин, Лазарев, 1986). Следовательно, индуцированный аутолиз различных компонентов пищи может реализоваться и в кишечнике.

*Казеинлитическая и гемоглобинлитическая активность во всем организме потенциальных объектов питания планкто-и бентофагов.* Как известно, белки, будучи частью структур клеток и различных ферментов, участвующих в процессах аутодеградации и в энергетическом обмене, являются наиболее значительным органическим компонентом объектов питания рыб (Lloret et al., 2014). Поскольку белки играют решающую роль в рационе большинства видов рыб (Love, 1970, Шатуновский, 1980; Lloret et al., 2014), наибольший интерес представляет изучение влияния температуры на активность пептидаз во всем организме потенциальных объектов питания рыб. Как указывалось выше, в процессах аутодеградации жертвы помимо ферментов пищеварительной системы, участвуют многочисленные катепсины.

Начальные стадии протеолиза в лизосомах реализуют преимущественно катепсины В, D, Н и L. При pH 3.0 максимальная активность отмечается у катепсинов D, E и N; при pH 5.0 – катепсинов А, В, С, D и S, при pH 7.0 катепсинов – G, L и Н (Немова,, 1978; Кузьмина, 2005, 2015; Высоцкая, Немова, 2008). Свойства протеиназ у потенциальных объектов питания рыб изучены слабо. Известно, что значения pH 5.0–6.5 являются оптимальными для катепсина В из гепатопанкреаса карпа *Cyprinus carpio* (Aranishi et al., 1997 b). Для мышечных ферментов анчоуса *Engraulus japonica*, подобных ка-

тепсину L, оптимальными являются значение pH 6.0 (Heu et al., 1997). В результате активность фермента во всем организме потенциальных жертв рыб в значительной степени зависит от pH (таблица 3.1).

Таблица 3.1.

**Казеинлитическая и гемоглобинлитическая активность во всем организме потенциальных жертв ихтиофагов при разных значениях pH (по: Kuz'mina, Ushakova, 2010)**

pH	Активность пептидаз, мкмоль / (г • мин)			
	<i>Килька Clupeonella cultriventris</i>	<i>Ери Gymnocephalus cernua</i>	<i>Окунь Perca fluviatilis</i>	<i>Плотва Rutilus rutilus</i>
	Субстрат казеин			
5.0	0.50±0.04	0.80±0.06	2.20±0.06	0.48±0.05
7.4	0.37±0.04	0.92±0.06	1.39±0.07	1.01±0.03
8.5	0.65±0.03	1.13±0.05	1.22±0.07	1.28±0.06
	Субстрат гемоглобин			
3.0	2.87±0.11	1.34±0.06	9.64±0.11	0.77±0.03
5.0	2.39±0.04	0.98±0.06	4.17±0.10	0.60±0.05
7.4	1.48±0.05	1.07±0.05	2.35±0.08	0.89±0.03
8.5	2.00±0.09	1.37±0.03	2.57±0.04	1.40±0.03

Как показывает таблица, наивысший уровень активности казеинлитических пептидаз обнаружен у окуня при pH 5.0. У других видов рыб наибольший уровень активности фермента наблюдается в щелочной зоне pH. Важно, что активность гемоглобинлитических пептидаз у всех видов рыб выше, чем активность казеинлитических пептидаз. Наивысший уровень активности гемоглобинлитических пептидаз был обнаружен у окуня при pH 3.0. У других видов рыб максимальная активность гемоглобинлитических пептидаз наблюдается при разных значениях pH. При pH 3.0 и 5.0 в различных тканях рыб в основном функционируют катепсины, при pH 7.4 и 8.5 нейтральные и сериновые пептидазы пищеварительной системы. Следовательно, в процессах аутодеградации белка в тканях жертв ихтиофагов могут участвовать все пептидазы их организма (Kuz'mina, Ushakova, 2010).

При этом активность ферментов в тканях жертв значительно возрастает при их длительном пребывании в желудке в условиях кислых значений рН. Динамика этого процесса зависит от таксономии жертв и специфичности тканей. Наиболее низкий уровень пептидазной активности характерен для мышц, наиболее высокий – для кишечника. Однако степень увеличения ферментативной активности в кишечнике намного ниже, чем в мышцах рыб и гепатопанкреасе (Kuz'mina, 2008). Данные о влиянии температуры на ферментные системы всего организма объектов питания рыб до недавнего времени были фрагментарными (Кузьмина, 1999 а, 2015).

*Температурная зависимость казеинлитической и гемоглобинлитической активности во всем организме потенциальных объектов питания планкто- и бентофагов.* Форма кривой температурной зависимости пептидаз у разных видов гидробионтов значительно варьирует. В первую очередь это относится к величине температурного оптимума. Так, максимальные значения температурного оптимума казеинлитических пептидаз обнаружены у креветок *Penaeus orientalis* – 70°C (Oh et al., 2000). Температурный оптимум трипсина у рака *Procambarus clarkii* составляет 60°C (Kim et al., 1994), у крабов *Callinectes bellicosus* и *C. arcuatus* – 55°C (Diaz-Tenorio et al., 2006.). При этом величина температурного оптимума не всегда зависит от температуры среды обитания вида. Так, температурный оптимум трипсиноподобных пептидаз у тропического краба *Ocyropode ryderi*, бореально-арктического криля *Meganctiphanes norvegica* (Dittrich, 1990), рака-отшельника *Pagurus bernhardus* и краба *Clibanarius striolatus* составляет 50°C (Dittrich, 1992 а). Вместе с тем у эвритермного большого краба *Carcer pagurus* температурный оптимум равен 45°C, у стенотермной антарктической креветки *Chorismus antarcticus* – 40°C (Dittrich, 1990). Важно отметить, что различные молекулярные формы трипсина могут иметь разный температурный оптимум: у флоридского рака *Procambarus clarkii* 50°C – для изоформ С и D или 45°C – для изоформ А и В (Kim et al., 1996).

Температурная зависимость казеинлитических пептидаз у олигохет и личинок комаров, обитающих в бореальной зоне, представлена на рис. 3.7. Как показывает рисунок, температурный оптимум пептидаз составляет 50°C (личинки хаоборуса) или 60°C (олигохеты, личинки хирономид). Для всех видов беспозвоночных характер-

но резкое увеличение активности ферментов при температурах превышающих 30°C. При 0°C активность казеинлитических пептидаз составляет лишь около 10 % от максимальной активности.

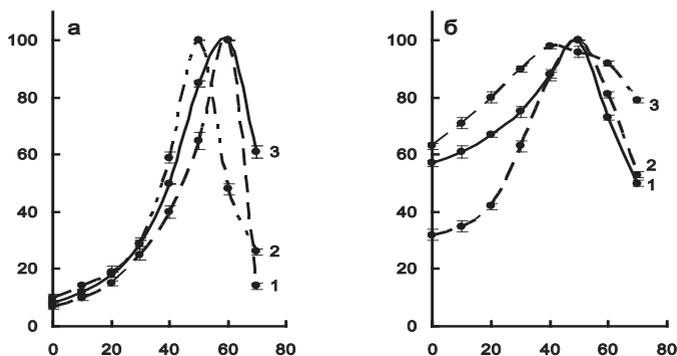


Рис. 3.7. Влияние температуры на казеинлитическую активность (а) и гемоглобинлитическую активность (б) у некоторых водных беспозвоночных (по: Кузьмина, 1999 а) Обозначения, как на рис 3.4. а: 1 – олигохеты *Tubific tubific*, 2 – личинки хоаборуса *Hoaborus sp.*, 3 – личинки хирономид *Chironomus plumosus*; б: 1 – дрейссена *Dreissena polymorpha*, 2 – личинки хирономид, 3 – зоопланктон (суммарно).

Температурная зависимость аспартатных, гемоглобинлитических, пептидаз значительно отличается от таковой сериновых, казеинлитических, пептидаз. Действительно, температурный оптимум гемоглобинлитических пептидаз у гидробионтов из того же водоема составляет 50°C у всех представителей бентоса (моллюски *Rabix ovata*, *Unio pectorum*, *Dreissena polymorpha* и личинки *Chironomus plumosus*) и 40°C у представителей зоопланктона. При этом активность гемоглобинлитических пептидаз в зоне низких температур выше по сравнению с таковой казеинлитических пептидаз (32% у личинок хирономид, около 55 % у моллюсков, 65 % у зоопланктона).

Важно отметить, что форма кривой температурной зависимости может различаться как у представителей одного типа, в частности моллюсков (рис. 3.8), так и у ферментов, функционирующих в разных тканях у рыб одного и того же вида (рис. 3.9). При этом, несмотря на сходство величины температурного оптимума гемоглобинлитических пептидаз всех тканей живородки *Viviparus viviparus* и перловицы *Unio pictorum* (60°C), представляющих классы брюхоногих *Gastropoda* и двустворчатых *Bivalvia* моллюсков, относительная актив-

ность в зоне низких температур у них различна. Вместе с тем у близкородственных видов – обыкновенного карася *Carassius carassius* и серебряного карася *Carassius gibelio* величины температурного оптимума значительно различаются: 50 и 60°C соответственно.

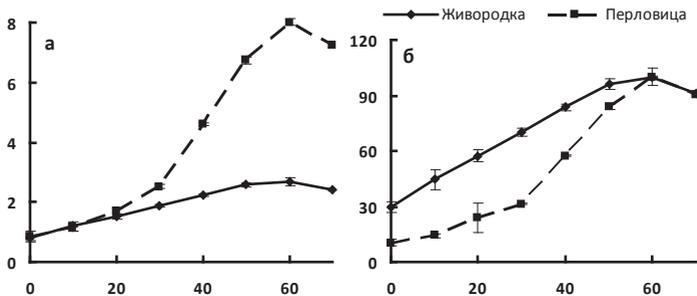


Рис. 3.8. Температурная зависимость гемоглобинлитических пептидаз всех тканей живородки и перловицы (по: Кузьмина и др., 2014 в)  
Обозначения, как на рис. 3.4.

Относительная активность пептидаз при 0°C у перловицы и обыкновенного карася составляет около 10%, у серебряного карася – около 20, у живородки – 30 % от максимальной активности. В зоне постмаксимальных температур наблюдаются еще большие видовые различия относительных величин активности. При 70°C относительная активность пептидаз висцеральных органов у серебряного карася составляет 6 %, мышц и икры – 35 и 41 %, у перловицы и живородки – 90 и 91 %, мышц обыкновенного карася – 97 % от максимальной активности.

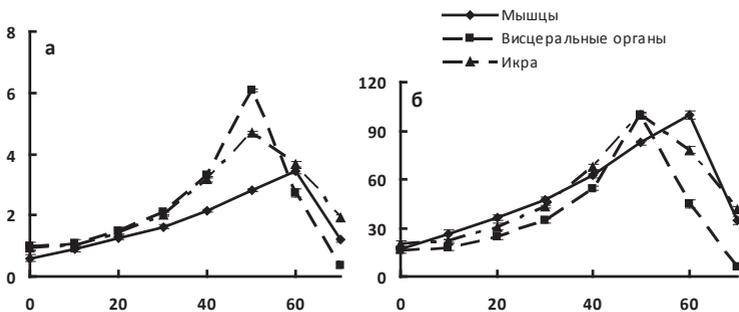


Рис. 3.9. Температурная зависимость гемоглобинлитических пептидаз мышц, висцеральных органов и икры у серебряного карася (по: Кузьмина и др., 2014 в).  
Обозначения, как на рис. 3.4.

Сопоставление характера температурной зависимости пептидаз во всех тканях рыб по казеину и гемоглобину позволило выявить видовые различия характеристик и у других видов рыб. Так, температурный оптимум пептидаз по казеину (рН 5.0) у стерляди *Acipenser ruthenus*, тюльки *Clupeonella cultriventris* и окуня *Perca fluviatilis* находится в зоне 50°C, у молоди рыб сем. карповых Cyprinidae (суммарная проба, преимущественно лещ *Abramis brama* и плотва *Rutilus rutilus*) – при 60°C. Относительная активность пептидаз при температуре 0°C у молоди карповых составляет 2.6 %, у остальных видов рыб – 8.3 % максимальной активности. В зоне постмаксимальных температур наблюдаются большие различия активности: при 70°C относительная активность пептидаз окуня близка к 0, тюльки соответствует 25.0, молоди карповых – 31.6, стерляди – 69.2 % (Шалыгин, 2013; Кузьмина, 2015).

Температурный оптимум пептидаз по гемоглобину (рН 3.0) у тюльки и окуня находится в зоне 40°C, у молоди карповых соответствует 50°C у стерляди – 60°C. Относительная активность пептидаз при температуре 0°C у стерляди составляет 16.4 %, у окуня – 20.1, у тюльки – 25.8 %, у молоди карповых – 37.3% максимальной активности. В зоне постмаксимальных температур наблюдаются более значительные видовые различия активности: при 70°C относительная активность пептидаз стерляди равна 2.9, тюльки – 5.5, молоди карповых – 19.3%. Активность гемоглоблилитических пептидаз окуня подавляется почти на 100 % (Шалыгин, 2013; Кузьмина, 2015).

Представленные результаты хорошо согласуются с данными, полученными при исследовании морских беспозвоночных. Так, значения температурного оптимума химотрипсина у крабов *Callinectes bellicosus* и *C. arcuatus* (Diaz-Tenorio et al., 2006), а также гребешка *Pecten maximus* соответствует 50–55°C (Le Chevalier et al., 1995). Максимальная активность ферментативного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* (субстрат гемоглобин) также отмечена при температуре 50–55°C (Мухин, Новиков, 1999). Пептидазная активность в пищеварительном тракте креветок *Penaeus californiensis* (Vega-Villasante et al., 1995) и крыля *Euphausia superba* (Yoshitomi, 2005) максимальна при температуре 50°C.

Как было показано выше, при кислых значениях рН основную роль в гидролизе биополимеров различных тканей животных играют

катепсины (Покровский, Тутельян, 1976; Высоцкая, Немова, 2008). Данные, касающиеся влияния температуры на активность катепсинов беспозвоночных немногочисленны. Известно, что температурный оптимум катепсина D значительно варьирует. Минимальные значения температурного оптимума обнаружены у тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* – 35°C (Sakai et al., 1981), максимальные у мидии *Mytilus edulis* – 60°C (Okada, Aikawa, 1986). Температурный оптимум катепсина D карпа *Cyprinus carpio* и мозамбикской тилапии *Tilapia mossambica* соответствует 50°C (Doke et al., 1980), а высокоочищенные препараты катепсина D из мышц сингиля *Mugil auratus* – 60°C (Bonete et al., 1984). Температурный оптимум катепсина B из гепатопанкреаса карпа *Cyprinus carpio* соответствует 45°C (Aranishi et al., 1997 а). Ферменты мышц анчоуса *Engraulis japonica*, подобные катепсину L, имеют температурный оптимум 50°C (Heu et al., 1997), катепсина L из мышц американского стрелозубого палтуса *Atheresthes stomias* – 60°C (Visessanguan et al., 2003).

В зоне низких температур также выявлена зависимость активности пептидаз от температуры обитания вида. Считается, что у видов, обитающих при высокой температуре окружающей среды, термостабильность ферментов выше, чем у видов, обитающих при низких температурах (Dittrich, 1992 b). Действительно, у тропического краба-привидения *Ocyropode ryderi* при 0°C активность пептидаз желудочного сока не отмечена, в то время как у антарктической креветки *Chorismus antarcticus* сохраняется более 10 % максимальной активности даже при температуре -0.5°C (Dittrich, 1990). У рачка *Euphausia superba*, обитающего в Антарктике, также выявлена активность пептидаз при 0°C (Yoshitomi, 2005). У бореального рака-отшельника *Pagurus bernhardus* при 0°C сохраняется до 55% активности пептидаз желудка, у тропического вида *Clibanarius striolatus* – лишь 1 % (Dittrich, 1992 а).

Сопоставление приведенных выше данных свидетельствует о слабой адаптированности казеинлитических пептидаз к функционированию при низких температурах. В частности, эффективность гидролиза белка казеинлитическими пептидазами личинок хирономид в диапазоне 0–20°C в 10.5 раз ниже, чем у гемоглобинлитических пептидаз, в зоне более высоких температур – лишь в 2.2 раза. Следовательно, сериновые пептидазы пресноводных беспозвоноч-

ных животных, обитающих в бореальной зоне, наиболее эффективны в летний период, когда температура воды превышает 20°C, в то время как аспартатные протеиназы (преимущественно катепсин D) достаточно эффективны и при более низких температурах. Последнее позволило предположить важную роль лизосомальных пептидаз объектов питания в процессах пищеварения рыб (Кузьмина, 1999 а; 2017).

*Энергия активации ферментов пищеварительного тракта рыб.* Энергия активации ( $E_{\text{акт}}$ ) ферментов, как известно, является одной из важнейших температурных характеристик ферментов. Величина  $E_{\text{акт}}$  показывает минимальное количество энергии (в расчете на 1 моль), которое требуется сообщить системе, чтобы произошла реакция. Значения энергии активации ферментов значительно варьируют в зависимости от вида гидробионтов, температуры и субстрата. Данные, касающиеся величин  $E_{\text{акт}}$  общей амилолитической активности у исследованных видов рыб Рыбинского водохранилища различны. Действительно, для всех видов характерен излом на графике Аррениуса, причем температура точки перегиба и величины  $E_{\text{акт}}$  у рыб разных видов в разных температурных зонах различны.

Так, у щуки *Esox lucius* в диапазоне 0–10°C значение  $E_{\text{акт}}$  соответствует 3.7 ккал/моль. При 10°C наблюдается скачкообразное изменение величины  $E_{\text{акт}}$  (8.2 ккал/моль), которая сохраняется в зоне температур, лежащих значительно выше диапазона физиологических температур. При исследовании налима *Lota lota*, леща *Abramis brama* и плотвы *Rutilus rutilus* более высокие значения  $E_{\text{акт}}$  обнаружены в зоне низких и физиологических температур, причем у двух первых видов, несмотря на различия в характере температурной зависимости, характеристики близки: в диапазоне 0–30°C значения  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза полисахаридов у налима соответствуют 11.2 ккал/моль, у леща – 12.3 ккал/моль. Для плотвы излом на графике Аррениуса отмечен при 20°C: величины  $E_{\text{акт}}$  равны 12.0 и 7.9 ккал/моль соответственно (Уголев, Кузьмина, 1993).

При исследовании характеристик  $\alpha$ -амилазы для большинства видов рыб излом на графике Аррениуса не обнаружен. В зоне физиологических температур самые низкие значения параметра обнаружены у типичных и факультативных хищников, более высокие – у типичных бенто- и планктофагов (рис. 3.10).

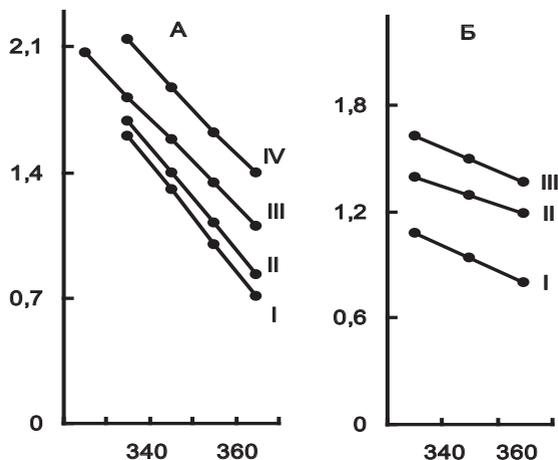


Рис. 3.10. График Аррениуса для  $\alpha$ -амилазы некоторых видов рыб (по: Уголев, Кузьмина, 1993)

Обозначения: на А: 1 – лещ, 2 – плотва, 3 – карп, 4 – карась, на Б: 1 – налим, 2 – щука, 3 – окунь. Цифры на графике соответствуют величинам кажущейся энергии активации, ккал/моль. По оси абсцисс – величина, обратная абсолютной температуре –  $1/T$  ( $10^5$ ), по оси ординат –  $\lg(V \cdot 10^5)$ , где  $V$  – скорость ферментативной реакции, мг / (г · мин).

Значения  $E_{\text{акт}}$  сахаразы у всех видов рыб во всем диапазоне исследованных температур постоянны. Минимальные значения  $E_{\text{акт}}$  отмечены у окуня (3.1 ккал/моль), максимальные – у плотвы (5.8 ккал/моль). При исследовании мальтазы обнаружена значительная общность характеристик ферментов у рыб, по типу питания относящихся к одной экологической группе. В группе типичных бентофагов минимальные значения  $E_{\text{акт}}$  установлены для плотвы (3.1 ккал/моль), максимальные – для карпа (4.0 ккал/моль). При исследовании мальтазы у хищных рыб обнаружен излом на графике Аррениуса (у щуки и окуня при 20°C, у налима при 10°C). В зоне низких температур значения  $E_{\text{акт}}$  у всех видов рыб близки – 1.9 и 2.2 ккал/моль. В зоне высоких температур значения  $E_{\text{акт}}$  у щуки соответствуют 3.6 ккал/моль, у налима и окуня 4.1 и 4.6 ккал/моль соответственно (Уголев, Кузьмина, 1993).

При исследовании щелочной фосфатазы у судака *Sander lucioperca* и леща *Abramis brama*, обитающих в Ладожском озере,

также отмечено скачкообразное изменение величины  $E_{\text{акт}}$  фермента. В диапазоне 0–10°C значения  $E_{\text{акт}}$  у судака и леща соответствуют 14.1 и 13.1 ккал/моль, в зоне 10–30°C – 7.3 и 11.5 ккал/моль соответственно или (Уголев и др., 1981; Ugolev et al., 1983). При исследовании форели излом на графике Аррениуса не отмечен: величина  $E_{\text{акт}}$  равна 9.4 ккал/моль (Егорова и др., 1974).

Значения энергии активации пептидаз слизистой оболочки желудка колеблются в узком диапазоне 2.2–2.6 ккал/моль (Кузьмина, 1990, Уголев, Кузьмина, 1993). Значения энергии активации пептидаз кишечника и химуса кильки *Clupeonella cultriventris* в пределах 10–30°C находятся в пределах 1.8–6.9 ккал/моль, у гибрида тилапии *Tilapia nilotica* × *T. aurea* – в диапазоне 20–30°C, энергия активации составляет 8.9 ккал/моль (El-Shemy, 1997). У атлантической трески *Gadus morhua* энергия активации гидролиза синтетических субстратов составляет 7.6 и 9.0 ккал/моль (Ásgeirsson et al., 1989). Исследования близких систематически рыб северных широт палтуса *Hippoglossus stenolepis* и звездной камбалы *Platichthys stellatus* показали, что при низких температурах 0–10°C значения пептидаз слизистой оболочки примерно в два раза ниже, чем при 10–20°C (Коростелев и др., 2005).

При определении величин  $E_{\text{акт}}$  пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони *Pelecus cultratus* был обнаружен излом на графике Аррениуса при 10°C (рис. 3.11).

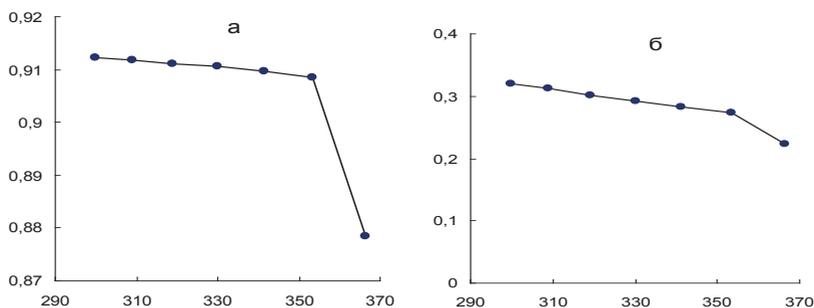


Рис. 3.11. График Аррениуса для казеинлитических (а) и гемоглобинлитических (б) пептидаз слизистой оболочки кишечника чехони (по: Кузьмина и др., 2017 в)   
 Обозначения: по оси абсцисс –  $1/T \times 10^5$ , где  $T$  – температура, °К, по оси ординат –  $\lg V$ , где  $V$  – скорость реакции, мкмоль/(г•мин).

Необходимо отметить, что в этой работе были получены исключительно низкие значения величин  $E_{\text{акт}}$ . При этом для зоны низких температур (0–10°C) характерны более высокие величины  $E_{\text{акт}}$  по сравнению с таковыми в зоне более высоких температур (10–60°C). Для казеинлитических пептидаз они составляют 1.06 и 0.09 ккал/моль, для гемоглобинлитических – 1.77 и 0.52 ккал/моль соответственно. Как подчеркивалось выше, этот феномен не был подтвержден. В настоящее время не ясно, чем обусловлены столь низкие величины  $E_{\text{акт}}$  пептидаз исследованной группы чехони.

Определение величины  $E_{\text{акт}}$  глицил-L-лейцин дипептидазы слизистой оболочки кишечника показало, что у глубоководных рыб и у атлантического бонито излом на графике Аррениуса отсутствует (Gelman et al., 1992). У большинства видов пелагических термофильных рыб, напротив, отмечен излом на графике Аррениуса. При этом в зоне более высокой температуры значения  $E_{\text{акт}}$  ниже, чем при низкой температуре, особенно у скумбрии (табл. 3.2).

Таблица 3.2.

**Энергия активации глицил-L-лейцин дипептидазы  
слизистой оболочки кишечника пелагических  
и глубоководных рыб (по: Gelman et al., 2008)**

Виды	Энергия активации, ккал/ моль		Температура точки перегиба, °C
	Ниже точки перегиба	Выше точки перегиба	
<i>Пелагические рыбы</i>			
Ставрида	17.3	13.4	15
Скумбрия	41.8	18.5	6
Сардина	17.4	13.4	5
Бонито	15.9	15.9	–
<i>Глубоководные рыбы</i>			
Тупорылый макрурус	14.4	14.4	–
Чёрная сабля-рыба	15.2	15.2	–
Большая черная акула	18.9	18.9	–

*Энергия активации ферментов во всем организме потенциальных объектов питания рыб.* Значения энергии активации пептидаз ферментов во всем организме потенциальных объектов питания рыб, как и в случае консументов, значительно варьируют в зависимости

от вида, температуры и субстрата. При исследовании  $E_{\text{акт}}$  пептидаз во всем организме беспозвоночных всех случаях точка разрыва в графике Аррениуса наблюдалась при 10 или 20°C (табл. 3.3).

Важно отметить, что в зоне 0–20°C значения  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических пептидаз у олигохет и личинок хоаборуса почти в два раза выше, чем при более высокой температуре. В то же время самые низкие значения  $E_{\text{акт}}$ , указывающие на большую эффективность процесса, отмечаются для гемоглобинлитических пептидаз. Так, в зоне низких температур и в зоне высокой температуры значения  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз не превышают 5.0 и 5.4 ккал/моль.

Таблица 3.3.

**Значения энергии активации пептидаз, функционирующих во всем организме потенциальных объектов питания планкто- и бентофагов (по: Кузьмина, 1999 а)**

Виды	Энергия активации, ккал/моль		Температура точки перегиба, °C	Температурный оптимум, °C
	Ниже точки перегиба	Выше точки перегиба		
Субстрат казеин				
<i>Tubifex tubifex</i>	19.3	5.6	20	60
<i>Choaborus sp.</i>	17.7	9.6	20	50
<i>Chironomus plumosus</i>	20.0	11.9	20	60
Субстрат гемоглобин				
<i>Rabix ovata</i>	5.0	2.9	10	50
<i>Unio pectorum</i>	3.6	1.6	10	50
<i>Dreissena polymorpha</i>	2.2	2.3	10	50
Зоопланктон	2.7	1.4	10	40
<i>Chironomus plumosus</i>	1.9	5.4	20	50

У личинок хирономид минимальное значение  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз при низкой температуре в 2.8 раза ниже, чем при высокой температуре. У других видов, напротив, значения этого параметра при низкой температуре в 1.4–2.8 раза выше, чем при высокой температуре. Относительно низкие значения  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз по сравнению с казеинлитическими

пептидазами во всем диапазоне исследованных температур свидетельствуют об их энергетических преимуществах в процессах аутодеградации, когда в результате посмертного изменения концентрации ионов водорода в тканях активность катепсинов значительно возрастает (Кузьмина, 1999 а).

Результаты, полученные при исследовании пресноводных беспозвоночных, сопоставимы с данными, полученными при изучении морских видов. Так, значения  $E_{\text{акт}}$  трипсиноподобных пептидаз у тропического краба *Clibanarius striolatus* в температурном диапазоне 0–40°C составляют 7.64 ккал/моль, у краба *Cancer pagurus*, обитающего в умеренных широтах – 5.92 ккал/моль, у антарктических видов *Glyptonotus antarcticus*, *Paraceradocus gibbera*, *Calanus acutus*, *Paraeuchaeta antarctica* и *Chorismus antarcticus* – 4.56, 4.46, 3.89, 3.56 и 2.84 ккал/моль соответственно (Dittrich, 1992b). При температурах, превышающих 10°C значения  $E_{\text{акт}}$  пептидаз у тропического краба *Clibanarius striolatus* выше (6.75 ккал/моль), чем у бореального краба-отшельника *Pagurus bernhardus* (4.77 ккал/моль) (Dittrich, 1992a). Значения  $E_{\text{акт}}$  катепсина D, выделенного из мантии мидии *Mytilus edulis*, составляют 13.0 ккал/моль в интервале температур 10–35°C (Okada, Aikawa, 1986).

Определение значений  $E_{\text{акт}}$  пептидаз, функционирующих во всем организме рыб, указывает на некоторые видовые различия параметра и его зависимость от температуры и субстрата (табл. 3.4).

Таблица 3.4.

**Энергия активации пептидаз, функционирующих  
во всем организме молоди рыб, в диапазоне температур  
их жизнедеятельности (по: Шалыгин, 2013)**

Виды	Субстрат казеин			Субстрат гемоглобин		
	0–10°C	10–20°C	20–30°C	0–10°C	10–20°C	20–30°C
Стерлядь	7.5	7.5	6.9	12.0	6.1	6.1
Тюлька	5.3	6.4	6.4	7.4	9.8	9.8
Сеголетки карповых	19.8	8.9	8.9	2.5	4.5	4.5
Окунь	6.0	10.3	10.3	2.7	8.8	8.8

Как показывает таблица, в большинстве случаев наблюдается резкое изменение значений  $E_{\text{акт}}$  пептидаз при 10°C, у стерляди

(по казеину) – при 20°C. У окуня в зоне более низких температур значений  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических пептидаз в 1.7 раза ниже, у сеголеток рыб сем. карповых – в 2.2 раза выше, чем в зоне более высоких температур. Наиболее существенное отличие процесса гидролиза гемоглобина заключается в уменьшении значений  $E_{\text{акт}}$  у ципринид и окуней во всем диапазоне жизнедеятельности рыб. Наиболее низкие значения  $E_{\text{акт}}$  гидролиза гемоглобина при температуре 0–10°C отмечены у стерляди. В то же время это единственный вид, у которого в зоне температур 10–30°C значения  $E_{\text{акт}}$  в два раза ниже, чем в зоне температур 0–10°C (у других видов эти значения в 1.3–3.2 раза выше).

При этом значения  $E_{\text{акт}}$  пептидаз по казеину в зоне жизнедеятельности рыб у потенциальных жертв близки или ниже, особенно в зоне низких температур (за исключением сеголеток карповых), чем в слизистой оболочке кишечника консументов (Уголев, Кузьмина, 1993). Высокие значения  $E_{\text{акт}}$  сеголеток рыб сем. карповых, по-видимому, свидетельствует о том, что жирнокислотный состав клеточных мембран их тканей еще не приспособлен для функционирования при температуре, близкой к нулю (Шалыгин, 2013). Значения  $E_{\text{акт}}$  катепсина D, обеспечивающего индуцированный аутолиз у беспозвоночных, также в зоне низких температур ниже по сравнению с пищеварительными гидролазами рыб (Кузьмина, 1999 а). Это указывает на более высокую эффективность гидролиза белковых компонентов пищи при низкой температуре лизосомальными пептидазами объектов питания по сравнению с пищеварительными ферментами рыб.

Следует отметить, что наиболее ярко выраженные изменения характеристик казеинлитических пептидаз тканей всего организма молоди рыб в зоне низких температур обнаружены только у рыб, зимовавших в естественных условиях. В то же время наиболее низкие значения  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз в этой зоне были обнаружены у аборигенных видов: ювенильных ципринид и окуня. Этот факт заслуживает особого внимания, так как значения  $E_{\text{акт}}$  трипсина слизистой у рыб из разных мест обитания в значительной мере близки. Например,  $E_{\text{акт}}$  трипсина слизистой по синтетическим субстратам (метилловый эфир тозил-аргинина и бензоил-аргинин нитроанилид) в зоне жизнедеятельности холодноводной атлантиче-

ской трески *Gadus morhua* составляет 7.6 ккал/моль и 9.0 ккал/моль соответственно (Ásgeirsson et al., 1989). У гибрида тепловодной тилапии *Tilapia nilotica* / *T. aurea*  $E_{\text{акт}}$  составляет 8.9 ккал/моль в зоне 20–30°C (El-Shemy, 1997).

Таким образом значения  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических пептидаз тканей жертвы, как правило, выше, чем гемоглобинлитических пептидаз. Наиболее низкие значения  $E_{\text{акт}}$  характерны для гемоглобинлитических пептидаз окуня и сеголеток рыб сем. карповых, что указывает на их лучшую адаптированность к функционированию при низких температурах. Сравнение характеристик пептидаз тканей всего тела потенциальных объектов питания рыб с теми же параметрами пищеварительного тракта консументов (налим, щука и судак) подтверждает возможность их компенсаторной роли в процессах пищеварения рыб.

### **3.3. Сравнение влияния температуры на активность ферментов слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофлоры у разных видов рыб**

В последние десятилетия было показано, что эффективность трофических связей различных животных, в частности рыб, во многом зависит не только от особенностей функционирования ферментных систем консументов, но и от особенностей кормовой базы, а также энтеральной и ассоциированной микробиоты (Уголев, 1985; Кузьмина, 2005, 2015; Kuz'mina, 2017). Также было высказано предложение о возможной компенсаторной роли ферментов жертв и энтеральной микробиоты (Уголев, Кузьмина, 1993). Поскольку, как подчеркивалось ранее, белки играют решающую роль в рационе большинства видов рыб (Love, 1970; Щульман, 1972; Шатуновский, 1980; Lloret et al., 2014), особое внимание было уделено изучению влияния температуры на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофлоры у рыб, различающихся по типу питания. Однако публикации, касающиеся влияния температуры на ферментные системы слизистой оболочки кишечника, потенциальных объектов питания рыб и энтеральной микробиоты немногочисленны (Кузьмина и др., 2012 б, 2015а; Kuz'mina, 2017; Kuz'mina et al., 2017).

### 3.3.1. Влияние температуры на активность казеин- и гемоглоблинитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты рыб в летний период

Прежде всего, важно напомнить, что значения активности ферментов энтеральной микробиоты несопоставимы с таковыми слизистой оболочки кишечника и химуса из-за методических различий, в частности культивирования микробиоты (Кузьмина и др., 2012, 2015; Kuz'mina et al., 2015). В связи с этим ниже приведены лишь данные, относящиеся к относительной активности ферментов. Форма кривых температурной зависимости казеинлитических пептидаз, функционирующих в разных препаратах, у рыб разных видов различна. Как можно видеть, температурный оптимум казеинлитической активности пептидаз слизистой оболочки кишечника у всех видов рыб равен 50°C (рис. 3.12).

Как показывает рисунок, температурный оптимум пептидаз химуса у всех видов рыб находится при 50°C. У плотвы *Rutilus rutilus* наибольшие значения ферментативной активности химуса, существенно не отличающиеся от таковых температурного оптимума, наблюдается в зоне 30–50°C. Помимо этого, пептидазы плотвы оказались более устойчивыми, чем ферменты других видов рыб, к высоким температурам (60–70°C).

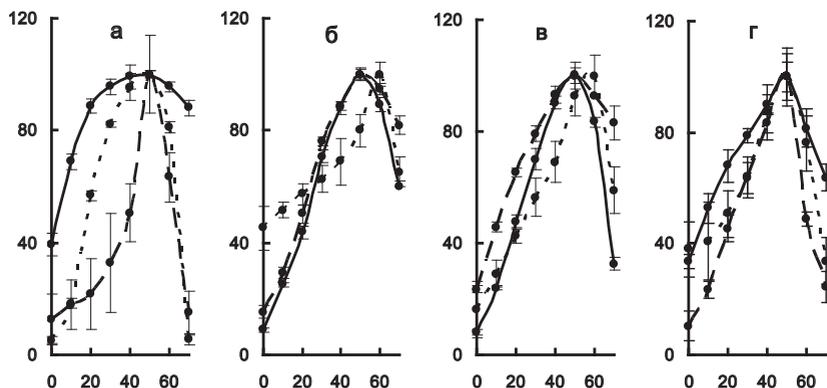


Рис. 3.12. Влияние температуры на казеинлитическую активность пептидаз химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (---●---) и энтеральной микробиоты (-.-●-.) у плотвы (а), карася (б), щуки (в) и окуня (г) в летний период (по: Kuz'mina, 2017) Обозначения, как на рис 3.4.

Также важно отметить, что у карася *Carassius carassius* и окуня *Perca fluviatilis*, активность пептидаз энтеральной микробиоты в зоне низких температур была значительно выше по сравнению с таковой слизистой оболочки кишечника и химуса. Действительно, при 0°C относительная активность казеинлитических пептидаз энтеральной микробиоты у окуня и карася составляет 38 и 45 %, у плотвы и щуки *Esox lucius* – менее 20 %.

Максимальные значения гемоглобинлитической активности пептидаз слизистой оболочки кишечника у плотвы и карася наблюдались при 60°C, у окуня и судака – при 50°C (рис. 3.13). Температурный оптимум гемоглобинлитических пептидаз химуса у окуня отмечен при 60°C, у судака – при 50°C. У плотвы высокие значения ферментативной активности химуса, существенно не отличающиеся от таковых при оптимальном температуре, наблюдались в зоне 30–50°C. При этом относительная гемоглобинлитическая активность химуса у плотвы была выше (40 %) таковой слизистой оболочки кишечника (13 %). Температурный оптимум гемоглобинлитической активности энтеральной микробиоты у плотвы был выше, чем таковой слизистой оболочки и химуса (60°C). Относительная гемоглобинлитическая активность энтеральной микробиоты у плотвы и судака при 0°C составляла не более 5 %, у окуня – 35 % от максимальной активности.

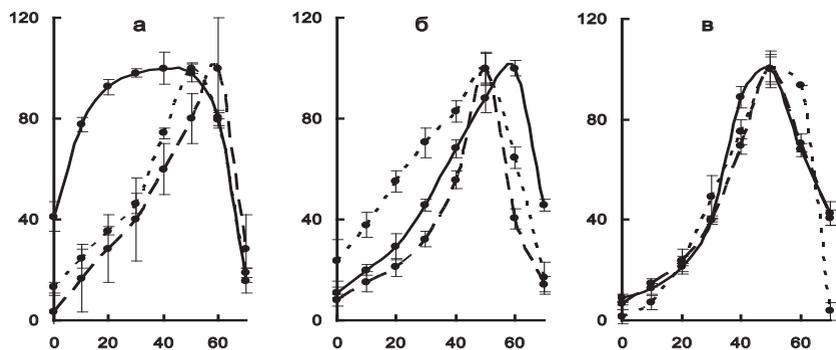


Рис. 3.13. Влияние температуры на гемоглобинлитическую активность пептидаз химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (---●---) и энтеральной микробиоты (-.-●.-.) у плотвы (а), окуня (б) и судака (в) в летний период (по: Kuz'mina, 2017).

Обозначения, как на рис 3.4

### 3.3.2. Влияние температуры на активность казеин- и гемоглоблилитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у ихтиофагов в зимний период

Опыты, проведенные зимой, показали, что у щуки *Esox lucius* температурный оптимум активности казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника соответствует 40°C, химуса – 60°C, кишечной микробиоты – 50–60°C (рис. 3.14).

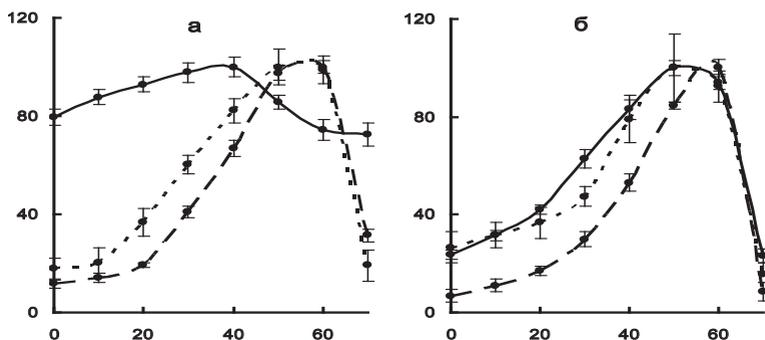


Рис. 3.14. Влияние температуры на активность казеинлитических (а) и гемоглоблилитических (б) пептидаз химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (—●—) и энтеральной микробиоты (- - ● - -) у щуки зимой (по: Шалыгин, 2017) Обозначения, как на рис 3.4.

При 0°C относительная активность пептидаз слизистой оболочки, химуса и микробиоты у рыб этого вида составляет 12, 80 и 18 % соответственно. Температурный оптимум гемоглоблилитической активности химуса и энтеральной микробиоты равен 50°C, слизистой оболочки кишечника – 60°C. При 0°C относительная активность ферментов слизистой оболочки составляет 7, химуса – 24, энтеральной микробиоты – 27 % максимальной активности. У налима *Lota lota*, наиболее активно питающегося зимой, температурный оптимум активности казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты в этот период соответствует 50°C, химуса – 30°C. Однако в зоне 20–50°C значения активности казеинлитических пептидаз химуса были близкими. При 0°C уровень активности пептидаз в случае слизистой оболочки, химуса

и энтеральной микрофлоры составлял 15, 45 и 25 % соответственно (рис. 3.15).

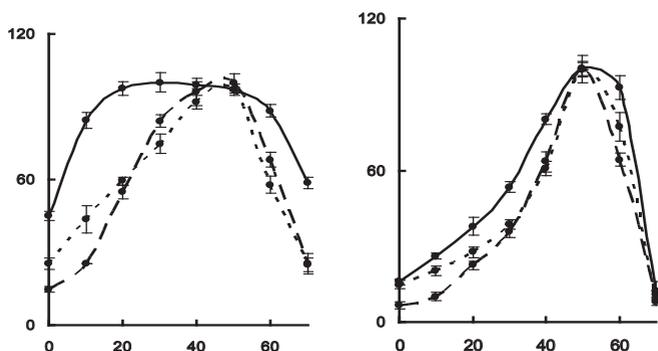


Рис. 3.15. Влияние температуры на активность казеинлитических (а) и гемоглобинлитических (б) пептидаз химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (---●---) и энтеральной микрофлоры (- - ● - -) у налима зимой (по: Шалыгин, 2013) Обозначения, как на рис 3.4.

Температурный оптимум гемоглобинлитических пептидаз всех исследуемых препаратов налима соответствовал 50°C. При 0°C уровень относительной активности пептидаз в случае слизистой оболочки, химуса и энтеральной микрофлоры составлял лишь 7, 16 и 15 % максимальной активности соответственно. Представленные результаты свидетельствуют о принципиальном сходстве температурных характеристик сериновых пептидаз слизистой оболочки кишечника у изученных видов рыб с данными, полученными ранее с использованием натуральных (Кузьмина, 1990) и синтетических субстратов (Pavlisko et al., 1997 a, b; Kishimura et al., 2006).

Различия в характеристиках казеин- и гемоглобинлитических пептидаз, вероятно, вызваны тем фактом, что эти ферменты гидролизуют пептидные связи в разных частях белковой молекулы. При использовании в качестве субстрата казеина гидролизуются пептидные связи в случае, когда карбоксильная группа образована основными аминокислотами с положительно заряженной боковой цепью (аргинин или лизин). При использовании в качестве субстрата гемоглобина гидролизуются пептидные связи в случае, когда карбоксильная группа связана с остатками ароматических аминокислот – фенилаланина, триптофана или тирозина (Dixon, Webb, 1964).

Наблюдаемое в ряде случаев увеличение активности ферментов химуса и энтеральной микробиоты в зоне физиологических, особенно низких, температур подтверждают гипотезу о том, что отсутствие адаптаций у пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб может быть компенсировано адаптивными изменениями характеристик ферментов микробиоты и объектов питания (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015). Действительно, относительная активность казеин- и гемоглобинлитических пептидаз химуса в зоне физиологических температур может достигать 90 % максимальной активности. Поскольку в составе химуса функционируют все ферменты тканей жертвы, особую роль в процессах аутодеградации играют многочисленные катепсины. Как пищеварительные ферменты, так и лизосомальные гидролазы обладают широким спектром действия. Наибольший вклад в гидролиз казеина и гемоглобина вносят катепсины В, D, Е и катепсины D, Е, А, G соответственно (Немова, 1978; Панин, Маянская, 1987). Еще одна группа ферментов, которая может участвовать в процессах аутодеградации, это цитозольные каспазы, реализующие при участии mTOR апоптоз, вызванный стрессом и асфиксией (Karahi et al., 2010; Мартынова, 2012).

Активность пептидаз энтеральной микробиоты выявлена у представителей многих родов, в частности р.р. *Pseudomonas* (Hamid et al., 1979; Hoshino et al., 1997; Belchior, Vacca, 2006), *Aeromonas* (Hamid et al., 1979; Trust et al., 1979), *Bacillus* (Skrodenytė-Arbačiauskienė, 2000; Ghosh et al., 2002; Esakkiraj et al., 2009; Askarian et al., 2012), *Vibrio* (Hamid et al., 1979;), *Acinetobacter* (Hamid et al., 1979; Askarian et al., 2012) и *Enterobacter* (Hamid et al., 1979; Ray et al., 2010). Несмотря на то, что пептидазы энтеральной микробиоты относятся к металлопротеиназам, форма кривых их температурной зависимости аналогична таковой сериновых пептидаз рыб. Так, температурный оптимум трипсин- и химотрипсинподобных пептидаз энтеральной микробиоты обычно соответствует 50°C. Однако относительная активность пептидаз энтеральной микробиоты в ряде случаев при 0°C выше, чем у ферментов рыб, и составляет 30–40 % от максимальной активности.

Данные, относящиеся к температурным характеристикам пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб, близки к результатам, полученным ранее для этих и других видов рыб (Уголев, Кузьмина,

1993а, Кузьмина, 2005, 2015; Gelman et al., 2008). При этом трипсин более устойчив к действию высоких температур, чем химотрипсин (Sabapathy, Тео, 1995; Alarcón et al., 1998). Так, химотрипсин у дорады *Sparus aurata* при 40°C сохраняет 25 % активности, при 50°C фермент денатурируется, тогда как активность трипсиноподобных пептидаз при тех же условиях близка к максимальной активности (Alarcón et al., 1998). Важно отметить, что относительная активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у разных видов рыб при 0°C составляет, как правило, не более 5–20 % от максимальной активности. Однако у некоторых видов рыб активность сериновых пептидаз, особенно трипсина, в низкотемпературной зоне может уменьшаться до следовых значений (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996).

Таким образом, выявлены значительные различия в температурных характеристиках казеин- и гемоглоблилитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у разных видов рыб. При этом характер кривых температурной зависимости пептидаз слизистой оболочки кишечника у разных видов рыб близок, пептидаз химуса и энтеральной микробиоты подвержен значительным изменениям. Относительная активность пептидаз слизистой оболочки кишечника при 0°C обычно составляет не более 5–15 % от максимальной активности. Относительная активность пептидаз химуса и энтеральной микробиоты в зоне низких температур часто значительно выше. Наиболее высокие значения относительной активности пептидаз химуса при 0°C (80 % для щуки), выявленные зимой, свидетельствуют об адаптации фермента к функционированию при низких температурах.

### **3.4. Влияние температуры на кинетические характеристики ферментов**

Исследования, выполненные в конце XX в., показали, что зависимость от температуры изменения активности пищеварительных гидролаз могут быть связаны не только с изменением скорости синтеза ферментов, но и с изменением их свойств. При этом установлена важная роль состава сред, в которой они функционируют (Егорова и др., 1974; Кузьмина, Голованова, 1983; Egorova, Ugolev, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008). Кроме того, описано влияние мембран

и мембранных липидов на характеристики ферментов (Кузьмина, Голованова, 1983, Уголев, Кузьмина, 1993, Kuz'mina et al., 1996, Gelman et al., 2008). Особое внимание было уделено изменению максимальной скорости реакции ( $V$ ) и кажущейся константы Михаэлиса-Ментен ( $K_m$ ). Ниже приведены некоторые результаты исследования влияния температуры на кинетические характеристики различных ферментов слизистой оболочки кишечника у ряда пресноводных и морских видов рыб.

*Влияние температуры инкубации и сезона на кинетические характеристики гликозидаз.* Кинетические характеристики гликозидаз у рыб разных видов при разной температуре в один и тот же сезон не постоянны. Так, при гидролизе крахмала максимальные значения  $V$  у окуня *Perca fluviatilis*, налима *Lota lota*, леща *Abramis brama*, плотвы *Rutilus rutilus* и карася *Carassius carassius* при 20°C примерно в 5.3, 6.2, 24 и 70 раз выше, чем у щуки *Esox lucius* (Kuz'mina et al., 1996). При 5°C эти различия менее значительны. Значения  $K_m$  у всех рыб ниже при 20°C, чем при 5°C (табл. 3.5).

Таблица 3.5.

**Влияние температуры на кинетические характеристики гликозидаз кишечника у некоторых рыб в осенний период (по: Kuz'mina et al., 1996)**

Виды	Температура инкубации			
	5°C		20°C	
	$K_m$ , mM	$V$ , мкмоль/(г•мин)	$K_m$ , mM	$V$ , мкмоль/(г•мин)
Гидролиз крахмала				
Налим	0.60±0.02	0.49±0.02	0.48±0.01*	1.33±0.20*
Щука	0.98±0.15	0.13±0.01	0.39±0.06*	0.18±0.04
Окунь	0.74±0.09	0.38±0.04	0.44±0.05*	0.95±0.11*
Лещ	1.72±0.34	1.67±0.14	0.65±0.06*	3.03±0.26*
Плотва	1.20±0.21	1.75±0.18	0.56±0.09*	4.35±0.28*
Карась	2.86±0.10	5.22±0.18	1.90±0.08*	12.50±0.43*
Гидролиз сахарозы				
Лещ	110±19.30	0.39±0.10	38±2.10*	0.72±0.24
Плотва	44±3.40	0.98±0.05	23±0.78*	1.60±0.11*

*Примечание.* Число рыб каждого вида составляет 12–45. С, P < 0,05. \* – достоверность различий между 5°C и 20°C, P < 0,05.

В случае гидролиза сахарозы значения  $V$  при  $20^\circ\text{C}$  в 2.2 раза выше у плотвы, чем у леща. При  $5^\circ\text{C}$  эти различия более заметны (2.5 раза). Значения  $K_m$  у этих видов рыб ниже при  $20^\circ\text{C}$ , чем при  $5^\circ\text{C}$ , особенно у леща. Видовые различия величин  $V$  наблюдаются на протяжении всего годового цикла рыб. Наиболее низкие значения  $V$  выявлены зимой, наиболее высокие – в летний период (таблица 3.6). Как показывает эта таблица, и зимой, и летом наименьшие значения  $V$  сахарозы наблюдались у щуки, более высокие – у леща и, особенно, у плотвы. Межвидовые различия в величине  $V$  были выше при  $20^\circ\text{C}$ , чем при  $0^\circ\text{C}$ , особенно в летний период. Значения  $K_m$ , напротив, у одного и того же вида рыб были ниже летом, чем зимой.

Таблица 3.6.

**Максимальная скорость реакции и константы Михаэлиса гидролиза углеводов при температуре инкубации, близкой к температуре окружающей среды, у некоторых видов рыб (по: Kuz'mina et al., 1996)**

Виды	Температура инкубации			
	$0^\circ\text{C}$ (зима)		$20^\circ\text{C}$ (лето)	
	$K_m$ , mM	$V$ , мкмоль/(г·мин)	$K_m$ , mM	$V$ , мкмоль/(г·мин)
Гидролиз крахмала				
Щука	2.45±0.37	0.17±0.02	0.81±0.13*	1.11±0.29*
Лещ	1.53±0.30	0.37±0.03	1.03±0.10	1.83±0.16*
Плотва	1.64±0.29	0.68±0.07	0.82±0.20	11.75±0.75*
Гидролиз сахарозы				
Щука	27.4±1.2	0.11±0.01	12.9±1.5*	0.18±0.04
Лещ	52.0±9.1	0.50±0.15	16.3±0.9*	0.82±0.34
Плотва	55.5±12.8	0.79±0.36	20.7±0.7*	2.55±0.18*

*Примечание*, как в табл. 3.5.

Низкие значения  $K_m$  у щуки позволяют сахарозе эффективно функционировать на протяжении всего годового цикла, а значительное снижение  $K_m$  у бентофагов летом исключительно важно, так как они начинают питаться при температурах, превышающих  $7\text{--}10^\circ\text{C}$ . (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina et al., 1996). В этой же работе выявлена значительная сезонная изменчивость кинетических характеристик щелочной фосфатазы (табл. 3.7).

Таблица 3.7.

**Максимальная скорость реакции и константы Михаэлиса щелочной фосфатазы у некоторых видов рыб при температуре инкубации, близкой к температуре окружающей среды (по: Уголев, Кузьмина, 1993)**

Виды	Кинетические характеристики щелочной фосфатазы							
	Зима		Весна		Лето		Осень	
	$K_m$	$V$	$K_m$	$V$	$K_m$	$V$	$K_m$	$V$
Щука	<u>0.40</u>	<u>0.48</u>	<u>0.08</u>	<u>0.09</u>	<u>0.21*</u>	<u>0.20*</u>	<u>0.70</u>	<u>0.32</u>
	0.20	0.12	0.05	0.03	0.06	0.04	0.21	0.07
Судак	<u>2.53</u>	<u>0.50</u>	<u>1.01</u>	<u>1.67</u>	<u>0.20</u>	<u>0.71</u>	<u>0.46</u>	<u>0.50</u>
	1.01	0.08	0.63	0.36	-	-	0.42	0.16
Налим	<u>0.08</u>	<u>0.35</u>	-	-	<u>0.84</u>	<u>0.60</u>	<u>0.46</u>	<u>0.64</u>
	0.05	0.15			0.23	0.14	0.16	0.11
Лещ	<u>0.63</u>	<u>0.44</u>	<u>0.23</u>	<u>0.46</u>	<u>0.18</u>	<u>0.66</u>	<u>0.44</u>	<u>0.39</u>
	0.18	0.12	0.17	0.11	0.07	0.04	0.20	0.09
Плотва	<u>0.44</u>	<u>0.30</u>	<u>0.18</u>	<u>0.41</u>	<u>0.39*</u>	<u>0.33*</u>	<u>0.39**</u>	<u>0.33**</u>
	0.15	0.04	0.09	0.10	0.06	0.04	0.06	0.09

*Примечание.* Рыбы, пойманные в августе, в течение 1 мес. находилась в аквариуме при температуре 18°C. \*\* Рыбы, пойманные в середине сентября, в течение 3 нед. находились в аквариуме при температуре 16°C. Верхние цифры 20°C; нижние цифры – 0°C.

Как показывает таблица, у всех видов рыб, за исключением налима, значения  $V$  максимальны, а значения  $K_m$  минимальны в весенний, летний или осенний период, что хорошо коррелирует с интенсивностью питания этих видов рыб. Важную роль в формировании кинетических характеристик собственно кишечных ферментов играют мембраны энтероцитов. Показано, что при взаимодействии слизистой оболочки кишечника с детергентами из фермент-мембранных комплексов высвобождаются целые глобулы ферментов, под воздействием протеаз выделяются только каталитически активные части молекул (Egorova, Ugolev, 1989).

Позднее было установлено, что деградация фермент-мембранных комплексов приводит к температурно-зависимым изменениям кинетических характеристик гликозидаз и щелочной фосфатазы у разных видов рыб. При этом солубилизация ферментов, как правило, вызывает увеличение значений  $K_m$  по сравнению с мембранно-связанной формой ферментов. В то же время значения  $V$  детергентной формы сахаразы уменьшаются по сравнению с мем-

бранно-связанной формой ферментов у всех видов рыб и при 0°C, и при 20°C. В результате солюбилизации у всех изученных видов рыб значения  $K_m$  увеличиваются в большей степени при 0°C, чем при 20°C (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina et al., 1996).

Одним из наиболее эффективных механизмов влияния на функционирование мембранных ферментов является изменение состава жирных кислот в липидах мембран энтероцитов (Kemp, Smith, 1970; Hochachka, Somero, 1971, 1973; Hazel, Prosser, 1974; Крепс, 1981). При исследовании жирнокислотного состава липидов слизистой оболочки кишечника у ряда видов рыб из Рыбинского водохранилища было показано, что, независимо от типа питания рыб, общее содержание липидов в слизистой оболочке кишечника варьирует от 1.3 до 2.8 % зимой и от 3.7 до 5 % влажного веса летом (Кузьмина и др., 1982, 1984). Состав жирных кислот (ЖК) в разные сезоны близок, однако содержание одной и той же ЖК у разных видов рыб может значительно варьировать (табл. 3.8).

Как показывает эта таблица, в зимний период у всех видов рыб преобладают ЖК с 14 и более атомами углерода. Помимо указанных ЖК встречаются минорные ЖК с меньшим количеством атомов углерода: 6–7 и выше у представителей сем. Cyprinidae (плотва, лещ), 8 и выше у представителей других таксономических групп. Состав ЖК в липидах слизистой рыб одного вида значительно варьирует. Так, у леща количество ЖК колеблется от 30 до 56, причем различия обусловлены главным образом короткоцепочными ЖК (6–15). При этом индивидуальная вариабельность ЖК состава в значительной мере обусловлена именно количеством минорных ЖК, которое не превышает десятых долей процента (Кузьмина и др., 1982).

Состав и число доминирующих ЖК у исследованных видов близки. Однако существуют некоторые видовые различия в содержании отдельных ЖК. Так, у судака содержится 3.4 % ЖК 20:2, у остальных видов рыб – менее 1 % от суммы ЖК. У некоторых видов рыб (судак, окунь) наблюдается более низкое содержание ЖК 18 : 1. Для других видов (налим, судак, плотва и лещ) характерна относительно высокая концентрация ЖК 16:1 и 20:5, а также низкое содержание ЖК 18:2. Данные по содержанию насыщенных, моноеновых и полиеновых ЖК в липидах слизистой кишечника рыб, как правило, в зимний период достаточно однородны. Соотношение на-

сыщенных и ненасыщенных кислот у большинства видов колеблется от 0.32 до 0.37, у налима – 0.29. Значение коэффициента  $\omega 3/\omega 6$  – отношение полиеновых ЖК  $\omega 3$  и  $\omega 6$  типа у большинства рыб близко 2.0. Летом в липидах слизистой доминируют следующие ЖК: 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 20:4  $\omega 6$ , 20:5  $\omega 3$  и 22:6  $\omega 3$  (Кузьмина и др., 1984).

Таблица 3.8.

**Содержание жирных кислот в липидах слизистой оболочки кишечника у бореальных видов рыб (% от суммы доминирующей) зимой (по: Кузьмина и др., 1982)**

Жирные кислоты*	Налим	Щука	Судак	Окунь	Плотва	Лещ
14 : 0	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.2	2.5	1.3	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.2
15 : 0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3	0.2	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2
16 : 0	13.2 ± 1.2	16.1 ± 1.3	17.5	10.7	17.4 ± 1.6	12.2 ± 1.1
16 : 1	8.6 ± 0.8	6.1 ± 0.5	8.9	4.5	10.3 ± 1.8	8.4 ± 1.1
17 : 1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4	0.4	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.3
18 : 0	6.5 ± 0.9	6.1 ± 0.6	5.0	5.5	7.0 ± 1.0	7.0 ± 0.3
18 : 1	18.3 ± 3.9	18.7 ± 4.9	13.7	14.1	19.1 ± 1.8	19.4 ± 1.3
18 : 2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.9	0.9	1.5 ± 0.5	0.6 ± 0.2
20 : 0+18 : 3	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.4	0.2	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2
20 : 1	4.2 ± 1.0	4.5 ± 0.9	4.0	5.3	2.4 ± 0.7	1.8 ± 1.0
20 : 2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.3	3.4	0.5	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1
21 : 0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.2	0.5	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1
20:3 + 22:0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6	0.3	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
20 : 4 $\omega 6$	8.2 ± 0.6	6.0 ± 1.8	9.1	10.9	5.0 ± 1.5	8.4 ± 1.7
20 : 4 $\omega 3$	1.2 ± 0.3	2.5 ± 1.9	0.9	0.7	1.6 ± 0.7	2.6 ± 1.7
20 : 5 $\omega 3$	9.4 ± 0.3	9.5 ± 2.7	11.3	9.2	8.1 ± 1.7	8.7 ± 1.6
22 : 4 $\omega 6$	2.7 ± 1.3	5.5 ± 0.6	3.5	7.5	1.9 ± 0.4	4.1 ± 1.9
22 : 5 $\omega 6$	2.9 ± 0.9	2.2 ± 0.5	1.5	3.0	2.8 ± 0.5	2.9 ± 0.4
22 : 5 $\omega 3$	3.2 ± 0.3	2.3 ± 0.5	3.3	3.5	3.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5
22 : 6 $\omega 3$	16.6 ± 1.1	16.2 ± 4.4	11.6	20.8	16.2 ± 2.7	14.8 ± 0.6
Н	21.7	23.8	26.0	18.4	26.1	21.5
М	31.8	29.7	27.0	24.3	32.3	30.6
П	46.4	46.6	47.0	57.2	41.6	47.9
$\sum \omega 3$	30.6	30.7	27.3	34.3	28.7	30.8
$\sum \omega 6$	14.7	14.6	16.0	22.3	10.8	16.0
$\sum \omega 3/\sum \omega 6$	2.0	2.1	1.7	1.5	2.7	2.0
Н / НН	0.28	0.31	0.35	0.23	0.35	0.27

Обозначения: \* Первая цифра означает количество атомов углерода, вторая – количество двойных связей. Н – насыщенные ЖК, М – моноеновые ЖК, П – полиеновые ЖК, Н / НН – соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК.

Сопоставление данных, полученных в зимний и летний периоды, показывает, что уровень липидов в слизистой кишечника рыб летом почти в 2 раза выше, чем зимой. Однако ЖК состав липидов слизистой кишечника у исследованных видов рыб в разные сезоны года близок, а количество отдельных ЖК у рыб разных видов различно. Содержание одной и той же ЖК у особей одной популяции в пределах сезона может значительно варьировать. Так, содержание докозагексаеновой ЖК у леща летом колеблется от 1.8 до 14.2 %. Несмотря на значительную внутривидовую вариабельность, в большинстве случаев выявляются сезонные перестройки ЖК состава, обусловленные изменением соотношения отдельных ЖК.

Наиболее значительные различия обнаружены при сопоставлении суммы насыщенных, моноеновых и полиеновых ЖК. Так, в зимний период содержание насыщенных ЖК колеблется в диапазоне 18.4–27.8 %, в летний – 40.0 – 65.4 %, моноеновых – 24.3–32.6 и 15.0–44.1 %, полиеновых – 41.5–57.2 и 16.0–38.6 % соответственно. Эти данные свидетельствуют о значительном (более чем в 2 раза) увеличении количества насыщенных ЖК и существенном снижении содержания полиеновых ЖК в слизистой кишечника рыб в летний период. В результате этого отношение насыщенных ЖК к ненасыщенным ЖК летом увеличивается в 2–5 раз. Также отмечены сезонные различия в содержании ЖК  $\omega$  3 и  $\omega$  6 типов. Первые, как известно, имеют меньшую температуру плавления, чем вторые. Если содержание ЖК  $\omega$  3 типа зимой колеблется в диапазоне 23.4–34.3, то летом – 6.6–21.1 %. Содержание ЖК  $\omega$  6 типа более стабильно. Величина отношения ЖК  $\omega$  3 типа и ЖК  $\omega$  6 типа летом в 1.5–2 раза меньше, чем зимой (Уголев, Кузьмина, 1993).

Приведенные материалы свидетельствуют о значительной сложности и лабильности ЖК состава липидов слизистой оболочки кишечника рыб, что позволяет мембранам энтероцитов и мембранным ферментам функционировать в условиях изменяющейся температуры. Этому способствует значительное содержание некоторых полиеновых ЖК, особенно докозагексаеновой кислоты  $\omega$  3 типа, имеющих более низкую температуру плавления (Ackman et al., 1967). Значительную роль в этом играет не только ЖК состав объектов питания рыб (Farkas, 1971; Gladyshev et al., 2000; Sushchik et al., 2003 a,b), но и температура. Последнее согласует-

ся с данными, полученными при изучении различных тканей рыб (Kemp, Smith, 1970, Hochachka, Somero 1971, 1973; Hazel, Prosser, 1974; Крепс, 1981).

### 3.5. Заключительные замечания

При изучении влияния температуры на активность ферментов слизистой оболочки было показано, что температурные характеристики различных ферментов, как правило, различны, температурные характеристики одноименных ферментов в большинстве случаев близки. Так, у щуки *Esox lucius* температурный оптимум  $\alpha$ -амилазы соответствует 30°C, сахаразы – 40°C, общей амилолитической активности – 50°C,  $\gamma$ -амилазы и мальтазы – 60°C. В то же время некоторые особенности температурной зависимости ферментов являются общими для рыб той же экологической группы. В частности, температурный оптимум  $\alpha$ -амилазы у ихтиофагов и ихтиофагов-факультативных бентофагов соответствует 30°C, а в зоне низких температур он составляет 50–70 % от максимальной активности (Уголев, Кузьмина, 1993).

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении чехони *Pelecus cultratus*, поскольку этот вид близок по таксономии планкто- и бентофагам, но по типу питания относится к группе ихтиофагов-факультативных планктофагов, и имеет кривую температурной зависимости  $\alpha$ -амилазы, характерной для хищных рыб (Кузьмина, Морозова, 1977). Еще более парадоксальные характеристики были выявлены при изучении влияния температуры на активность пептидаз (Кузьмина и др., 2017). Однако выявленный феномен требует дальнейшего исследования.

Данные, касающиеся температурной зависимости собственно кишечных ферментов, в меньшей степени зависят от особенностей биологии изученных видов рыб. Важно отметить, что значение температурных оптимумов ферментов группы мальтаз в большинстве случаев соответствует 60°C, более низкие значения (50°C) установлены только для одного вида – налима *Lota lota*, относящегося к арктическому фаунистическому комплексу. При изучении влияния температуры на активность щелочной фосфатазы было показано, что температурный оптимум фермента у судака и леща из Ладожского озера соответствует 45 и 40°C, у рыб из Рыбинского водо-

хранилища, расположенного южнее – 40 или 50°C, соответственно (Кузьмина, 1985). Эти данные близки результатам многочисленных исследований, касающихся зависимости термостабильности тканей и различных белков, в основном ферментативных, от температурных условий среды обитания вида (Ushakov, 1964, Ушаков, 1974, 1982, Hochachka, Somero, 1971, 1973, 2002; Hazel, Prosser, 1974; Александров, 1975; Gelman et al., 2008; Somero et al., 2017).

Температурные характеристики одноименных ферментов химуса в ряде случаев значительно отличаются от таковых слизистой оболочки кишечника. Наибольшие различия обнаружены при сравнении относительной активности ферментов: в зоне низких температур относительная активность ферментов химуса значительно выше таковой слизистой оболочки. У ряда видов рыб наибольший уровень относительной активности пептидаз в этой зоне был обнаружен при изучении энтеральной микробиоты (Шалыгин, 2013; Kuz'mina et al., 2015). Эти данные подтвердили предположение о том, что ферменты энтеральной микробиоты могут играть компенсаторную роль при питании рыб в условиях низких температур (Уголев, Кузьмина, 1993). При этом компенсаторные изменения характеристик энтеральной микробиоты, по-видимому, обусловлены ее различным видовым составом у разных видов рыб (Kuz'mina et al., 2015).

Поскольку значения температурного оптимума и термостабильности ферментов не всегда коррелируют с температурой среды обитания вида (Ушаков, 1974; Александров, 1975; Gelman et al., 2008), исключительно важны данные, касающиеся  $E_{\text{акт}}$  ферментов. Так, для  $\alpha$ -амилазы была установлена зависимость величины  $E_{\text{акт}}$  от типа питания рыб: в зоне 10–30°C значения  $E_{\text{акт}}$  у ихтиофагов в 2–4 раза ниже, чем у планкто- и бентофагов. При изучении характеристик мальтазы у ихтиофагов на графике Аррениуса был обнаружен излом в зоне минимальных значений  $E_{\text{акт}}$ , соответствующих температурам наиболее активного питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Для Cyclostomata (минога *Lampetra fluviatilis*) и большинства морских видов рыб значения  $E_{\text{акт}}$  постоянны в диапазоне физиологических температур, но в ряде случаев были обнаружены изломы на графике Аррениуса. При этом наименьшие значения  $E_{\text{акт}}$  соответствовали температуре, при которой рыбы питаются (Егорова и др., 1974; Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008).

Данные о влиянии температуры на кинетические характеристики ферментов также указывают на значительную роль этого фактора. При этом наблюдается последовательное увеличение  $V$  исследованных гидролаз с повышением температуры, а также разнонаправленные изменения величин  $K_m$ . Действительно, для гликозидаз, гидролизующих полисахариды и дисахариды, отмечается уменьшение значений  $K_m$  и, следовательно, увеличение сродства фермента к субстрату при увеличении температуры.

Для щелочной фосфатазы, гидролизующей эфиры ортофосфорной кислоты, напротив, отмечается увеличение значения  $K_m$  при повышении температуры. Летом значения  $K_m$  при тех же температурах ниже, чем зимой. Важно, что значения  $K_m$  щелочной фосфатазы при температуре среды обитания рыб в летний и зимний периоды практически одинаковы, причем значения  $K_m$  сахаразы значительно ниже летом, чем зимой. Низкие значения  $K_m$  ферментов весной, совпадающие с периодом нереста у большинства видов рыб (Поддубный, 1971), подтверждают значительное влияние факторов внутренней среды организма, по всей вероятности, стероидных гормонов на кинетические характеристики ферментов (Уголев, Кузьмина, 1993).

Также важно отметить роль отдельных компонентов фермент-мембранных комплексов в формировании характеристик мембранных ферментов. Прежде всего, следует отметить, что высвобождение молекул ферментов из состава мембран щеточной каймы энтероцитов приводит к сужению зоны оптимальных значений температуры, особенно ярко выраженной в случае гликозидаз. В ряде случаев регистрируется последовательное снижение уровня относительной активности ферментов в зоне постмаксимальных температур по мере деградации фермент-мембранных комплексов (Уголев, Кузьмина, 1993). Экстракция липидов из слизистой оболочки также приводит к изменению характеристик ферментов, особенно значимых в случае сахаразы (смещение температурного оптимума влево, а также увеличение относительной активности ферментов в условиях низких температур).

Разрушение фермент-мембранных комплексов приводит к значительному изменению кинетических характеристик ферментов. Значения  $V$  по мере деградации фермент-мембранных комплексов последовательно снижаются. Характер изменения значений

$K_m$  зависит от исследуемых ферментов: значения  $K_m$  дисахаридаз увеличиваются по сравнению с М-формой ферментов, изменение значений  $K_m$  щелочной фосфатазы зависит от вида рыб. Близкая закономерность изменения значений  $K_m$  отмечена в экспериментах по делипидации мембран эритроцитов. Представленные результаты хорошо согласуются с представлениями о важной роли структурирования ферментов, реализующих процессы мембранного пищеварения (Уголев, 1972, 1985; Stanley, Lusio, 1978; Brassitus et al., 1980; Ugolev et al., 1983; Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008).

Значительная роль принадлежит липидному матриксу мембран эритроцитов (Johnston, Roots, 1964, Hochachka, Sommero, 1971, 1973; Hazel, Prosser, 1974; Brasitus et al., 1979, 1980; Крепс, 1981; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). При изучении жирнокислотного состава липидов слизистой оболочки кишечника у рыб разных видов выявлены особенности, позволяющие мембранам эритроцитов функционировать в условиях изменяющейся температуры. В частности, продемонстрировано наличие ряда полиеновых жирных кислот, в том числе ЖК  $\omega$ -3 типа, особенно докозагексаеновой кислоты, имеющих более низкую температуру плавления, а также сезонные изменения содержания отдельных ЖК в липидах слизистой оболочки кишечника (Кузьмина и др., 1982, 1984).

Важно отметить, что экстракция липидов слизистой оболочки кишечника рыб при помощи ацетона приводит к значительному снижению максимальной скорости реакции и изменению значений  $K_m$  по сравнению с контролем. Значения  $K_m$  процесса гидролиза углеводов (мальтазы, сахаразы) изменяются по-разному, в то время как величины  $K_m$  щелочной фосфатазы, как правило, уменьшаются. Кроме того, показано, что температура влияет на значения  $K_m$  ферментов, функционирующих в составе делипидированных препаратов (Ugolev et al., 1983; Уголев Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008).

Таким образом, температура оказывает значительное влияние на активность и характеристики ферментов, обеспечивающих процессы пищеварения у рыб. При этом существенную роль играют все компоненты фермент-мембранных комплексов, включая гидрофобные части ферментов и липидный матрикс мембран.

## **Глава 4. Влияние рН на активность пищеварительных гидролаз рыб**

Хорошо известно, что оптимальные значения рН ферментов, гидролизующих различные химические связи, различны. Также наблюдаются видовые особенности рН зависимости одноименных гидролаз. При этом ферменты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта рыб изучены более подробно (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015; Bakke et al., 2011; Кузьмина и др., 2016), чем ферменты химуса (Кузьмина, 2005). Помимо этого, в пищеварительном тракте рыб функционируют ферменты, синтезированные энтеральной микробиотой, а также микробиотой, ассоциированной с объектами питания рыб (Кузьмина, 2005, 2015; Кузьмина и др., 2016). Однако до недавнего времени их характеристики были слабо изучены.

### **4.1. Значения рН слизистой оболочки и содержимого пищеварительного тракта рыб**

Первые сведения о наличии соляной кислоты в желудке костистых рыб появились в начале XVIII в. (Tiedeman, Gmelin, 1827, цит по: Пегель, 1950). Позднее значительное внимание уделялось изучению реакции желудочного сока и содержимого желудочно-кишечного тракта у рыб разных таксономических групп, в том числе хрящевых рыб (см.: Vonk, 1937). В настоящее время хорошо известно, что значения рН в пищеварительном тракте у различных видов рыб варьируют от 1.6 до 10.5. Кислые значения рН характерны для желудка, щелочные или нейтральные значения – для кишечника (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Chong et al., 2002; Solovyev et al., 2017).

Хрящевые рыбы способны секретировать очень кислый желудочный сок – рН 0.4 (Papastamatiou, Lowe, 2004, 2005). При этом у акулы *Carcharhinus melanopterus* кислота секретируется непрерывно, даже в период длительного голодания, со средним значением рН  $1.66 \pm 0.40$  в пустом желудке (Papastamatiou et al., 2007). Эти значения близки результатам, полученным ранее при исследовании желудоч-

ного сока у акул *Scyllium stellare* – 1.69 (van Herwerden, Ringer, 1911, цит. по: Fange, Grove, 1979). При этом есть сведения о нейтральной и щелочной реакции желудочного сока у акул. Однако значения pH резко снижаются в процессе пищеварения (Fange, Grove, 1979).

В желудке костистых рыб обычно идентифицируется один тип клеток, (оксинтопептические клетки), ответственных за секрецию желудочными железами кислоты и пепсина (Barrington, 1957; Western, Jennings, 1970; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Веригина, Жолдасова, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993). Вместе с тем есть сведения о раздельной секреции кислоты и пепсина у рыб. В частности, описаны клетки, выделяющие только соляную кислоту (Gawlicka et al., 2001), но не было обнаружено корреляции между уровнями секреции кислоты и пепсина (Smit, 1968).

Значения pH желудочного сока и содержимого желудка у костистых рыб значительно выше, чем у хрящевых рыб. Так, значения pH в желудке канального сомика *Ictalurus punctatus* соответствуют 1.95–4.40 (Page et al., 1976), дорады *Sparus aurata* – 2.5–5.5 (Deguara et al., 2003), окуня *Perca fluviatilis*, тилапии *Tilapia mossambica* (Fish, 1960) и большеротого окуня *Micropterus salmoides* (Sarbah, 1951) – 3.0–5.0, налима *Lota lota* – 5.08 (Izvekova et al., 2013), окуня и судака *Sander lucioperca* – 7.1 и 6.7 в пустом желудке, а также 3.5 и 4.7 – в полном желудке соответственно (Соловьев и др., 2015). Также показано, что у некоторых видов, таких, как рыба-хирург *Acanthurus nigrofuscus* и форель *Oncorhynchus mykiss*, секреция соляной кислоты в желудке происходит непрерывно, поддерживая низкий уровень pH в отсутствие пищи (Montgomery, Pollak, 1988; Bucking, Wood, 2009). Однако у таких рыб, как белый сарг *Diplodus sargu*, бельдюга *Zoarces anquillaris*, окунь *Perca fluviatilis* и судак *Sander lucioperca* нейтральные значения pH поддерживаются в пустом желудке, а секреция соляной кислоты начинается в ответ на потребление пищи (MacKay, 1929; Deguara et al., 2003; Yufera et al., 2004, 2012; Nikolopoulou et al., 2011; Соловьев и др., 2015).

В отделе кишечника хрящевых рыб (акулы, скаты), отличающемся наличием спирального клапана, pH соответствует 7.0–7.5, в задней части кишечника – 5.5–6.4, в зависимости от вида (Anderson et al., 2010). Значения pH кишечника у разных видов костистых

варьируют в широких пределах – от слабокислых до щелочных. Так, у дорады рН изменяется в диапазоне 6.5–7.9 (Deguara et al., 2003), у окуня и судака – 6.5–7.2 (Solovyev et al., 2015), у канального сомика – 6.6–8.7 (Page et al., 1976), у сига *Siganus canaliculatus* – 7.1–9.57 (Sabapathy, Тео, 1994), у налима – 7.2–7.5 (Izvekova et al., 2013). При этом рН пищеварительного тракта может изменяться в зависимости от времени суток (Montoya et al., 2010), а также сезона: в холодное время значения рН в кишечнике у ряда видов рыб выше, чем летом (Solovyev et al., 2017). Величины рН в пилорических придатках ниже, чем в кишечнике рыб (Izvekova et al., 2013; Соловьев и др., 2015). На ранних стадиях пищеварения рН химуса у рыб может соответствовать рН 6.2–6.5 (Deguara et al., 2003). В ряде работ отмечены проксимально-дистальные градиенты значений рН. У дорады более низкие значения рН находятся в проксимальной части (Deguara et al., 2003), у канального сомика (Page et al., 1976), налима (Izvekova et al., 2013) и язя *Leuciscus idus* (Solovyev et al., 2015) – в медиальной части, у карася *Carassius auratus gibelio* и карпа *Cyprinus carpio* – в дистальной части кишечника.

#### **4.2. Влияние рН на активность ферментов слизистой оболочки, содержимого пищеварительного тракта, энтеральной и ассоциированной микробиоты рыб**

*Влияние рН на активность пептидаз. Значения оптимума рН пептидаз значительно варьируют в разных частях пищеварительного тракта.* Прежде всего, важно отметить, что пепсин желудка при нейтральном значении рН находится в неактивной форме пепсиногена и становится активным при рН ниже 4.0 (Yufera et al., 2012). Для большинства видов рыб оптимум рН пепсина характерен в зоне 1.6–3.5 (Twining et al., 1983; Munilla-Moran, Stark, 1990; Sabapathy, Тео, 1993; Natalia et al., 2004 Соловьев и др., 2015). Однако в желудке налима максимальная активность пептидаз регистрируется в пределах рН от 2.9 до 4.3 (Izvekova et al., 2013).

Оптимальные значения рН пептидаз, функционирующих в кишечнике рыб, находятся в диапазоне рН 7.6–10.0 (Nagase,

1964; Overnell, 1973; Hjelmeland, Raa, 1982; Clark et al., 1985; Das, Tripathi, 1991; Eshel et. al, 1993; Alarcón et al., 1998; Hidalgo et al., 1999; Castillo-Yanez et al., 2005, 2006; Natalia et al., 2004; Hau et al., 2006; Kumar et al., 2007; Kishimura et. al., 2006, 2008; Соловьев и др., 2015; Кузьмина, 2015; Кузьмина и др., 2014 а, 2015 а, 2016а, б; Kuz'mina, 2011, 2017), иногда при pH 11.0 (Kumar et al., 2007; Неваленный и др., 2011). Высокий уровень протеолитической активности при pH 9–10 может быть обусловлен активностью трипсина и химотрипсина (Jany, 1976), а также коллагеназы и эластазы (Hidalgo et al., 1999). По данным ряда авторов, оптимум pH трипсина выше, чем химотрипсина (Clark et al., 1985; Uys, Hecht, 1987; Martinez, Sierra, 1989). При этом значение оптимума pH в значительной мере зависит от субстрата: при использовании в качестве субстрата казеина максимальная активность трипсина и химотрипсина висцеральных органов японского анчоуса *Engraulis japonicus* соответствует 9.0, при использовании синтетических субстратов – при pH 8.0 (Heu et al, 1995.). У индийского анчоуса *Stolephorus indicus* оптимум pH пептидаз при использовании казеина соответствует 8.5, при использовании гемоглобина – 9.5 (Siringan et al., 2007). Оптимальные значения pH аминопептидазы у карпа *Cyprinus carpio* соответствуют 7.4 (Хаблек, Проскураков, 1983), у трески *Gadus morhua* – 8.0 (Overnell, 1973), у Европейской солеи *Solea solea* – 8.3 (Clark et al., 1986). Оптимум pH аминопептидазы у личинок красного горбыля *Sciaenops ocellatus* находится при 7.8 (Lazo et al., 2007).

У беспозвоночных, потенциальных объектов питания бентофагов, оптимум pH пептидаз обычно находится в диапазоне от 7.5 до 8.5 (Dendinger, O'Connor, 1990; Le Chevalier et al., 1995; Vega-Villasante et al., 1995; Oh et al., 2000; Fernández Gimenez et al., 2001). Однако у некоторых пресноводных животных оптимум pH трипсино- и химотрипсинподобных пептидаз соответствует 6.0–8.0 (Diaz-Tenorio et al., 2006; Navarrete del Toro et al., 2006). Пептидазы микроорганизмов обычно проявляют максимальную активность при нейтральных или щелочных значениях pH, но иногда в зоне кислых значений pH (Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2008). Эти различия в значительной степени зависят от состава культуральной среды (рис. 4.1).

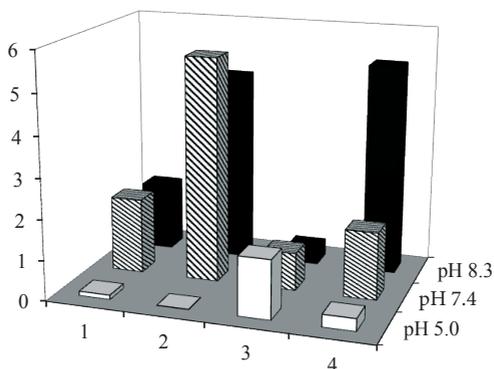


Рис. 4.1. Казеинлитическая активность пептидаз энтеральной микробиоты щуки, культивируемой на различных средах при различных значениях рН (по: Кузьмина и др., 2002). Обозначения: 1 – рыбный пептон, 2 – казеин, 3 – молоко, 4 – среда Имшенецкого, по вертикали – активность ферментов, мкмоль/(г мин)

*Влияние рН на активность гликозидаз.* Оптимум рН гликозидаз, функционирующих в кишечнике большинства видов рыб, находится в диапазоне 7.0–8.0 (Nagase, 1964, Кузьмина, Неваленный, 1983; Munilla-Moran, Saborido-Rey, 1996; Alarcon et al, 2001; Fernandez et al., 2001; Parra et al, 2007; Неваленный и др., 2011; Кузьмина, 2015; Кузьмина и др., 2016 б). В ряде публикаций сообщается, что оптимальные значения рН шире этих пределов – 6.0–9.0 (Nagase, 1964; Уголев, Кузьмина, 1993; Fernandez Gimenez et al., 2001). В то же время известно о резком снижении амилалитической активности при рН 5 (Кузьмина, Неваленный, 1983, Fernandez Gimenez et al., 2001, Alarcon et al, 2001, Munilla-Moran, Saborido-Rey, 1996 b).

Наибольший интерес представляют характеристики  $\alpha$ -амилазы, находящейся в начале цепи ферментов, гидролизующих углеводы. Оптимальные значения рН  $\alpha$ -амилазы значительно различаются у разных видов рыб. Так, максимальная активность  $\alpha$ -амилазы у ханоса *Chanos chanos* и сига *Siganus canaliculatus* наблюдается при рН 6.2 (Clark et al, 1985), у тилапии *Tilapia mossambica* и Европейской солеи *Solea solea* – при рН 6.7 (Nagase, 1964; Clark et al, 1985), у обыкновенного толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* и пестрого толстолобика *Aristichthys nobilis* – при рН 7.0 (Bitterlich, 1985), у леща *Abramis brama*, судака *Sander lucioperca* и налима *Lota lota* – при рН 7.0–7.5 (Ананичев, 1959).

Однако в ряде исследований обнаружен больший диапазон оптимальных значений pH  $\alpha$ -амилазы, включая значения 5.5 и 8.5 (Уголев, Кузьмина, 1993). При исследовании общей амилолитической активности (активность  $\alpha$ -амилазы,  $\gamma$ -амилазы и ферментов группы мальтаз) в единых методических условиях у плотвы *Rutilus rutilus*, леща *Abramis brama*, синца *A. ballerus* и щуки *Esox lucius* максимальная активность обнаружена в зоне pH 7.0–8.0, у судака *Sander lucioperca* – в зоне pH 6–8, у окуня *Perca fluviatilis* – при pH 8.0 (Кузьмина, Голованова, 1980). Позднее было показано, что замена раствора Рингера фосфатным буфером, который часто используется при получении гомогенатов, максимум значений pH общей амилолитической активности у большинства видов рыб сдвигается влево – от 7.0–8.0 до 6.5–7.0 (Кузьмина, Неваленный, 1983).

Изучение pH зависимости у пяти видов рыб сем. Sparidae позволило обнаружить различное количество пиков  $\alpha$ -амилазы: у красного пагра *Pagrus pagrus* и у бобса *Boops boops* пик активности обнаружен при pH 7.0, у пагелла красного *Pagellus erythrinus* и у ласкиря *Diplodus annularis* – два пика при pH 7.0 и 9.0, а также в 6 и 9 соответственно, у красноперого пагеля *Pagellus bogaraveo* – три пика при pH 4, 6 и 8 (Fernandez Gimenez et al, 2001). Присутствие нескольких изоформ  $\alpha$ -амилазы было подтверждено при изучении рыб, значительно различающихся по таксономии и экологии: у карася *Carassius auratus gibelio*, язя *Leuciscus idus*, карпа *Cyprinus carpio*, окуня *Perca fluviatilis* и судака *Sander lucioperca* обнаружено два пика активности  $\alpha$ -амилазы – при pH 7.0 и 9.0 (Соловьев и др., 2015).

Оптимум pH мальтазы у круглоротого бычка *Neogobius melanostomus* находится в зоне 6.0–8.0, в форели *Salmo gairdneri* – при 7.0, у плотвы *Rutilus rutilus* и леща *Abramis brama* – в зоне 7.0–8.0, у щуки *Esox lucius* – при 8.0 (Кузьмина, Неваленный, 1983; Уголев, Кузьмина, 1993). Данные, касающиеся оптимума pH сахаразы, близки таковым мальтазы. Так, для плотвы характерна широкая зона высокой активности сахаразы (6.0–8.0). Оптимум pH сахаразы у леща выявлен при pH 7.0, у щуки – при pH 6.0. Солюбилизация ферментов с помощью тритона X-100 приводит к значительному сужению зоны значений pH, близких оптимальным (pH 8.0), у плотвы, но не вызывает изменения у щуки (Уголев, Кузьмина, 1993).

У трески *Gadus morhua*, дорады *Sparus aurata* и красного горбыля *Sciaenops ocellatus* высокий уровень активности липазы наблюдается в диапазоне pH 7–9, с максимумом при значения pH, близких к 8.0 (Lazo et al., 2007). Оптимум pH неспецифических липаз, гидролизующих сложные эфиры жирных кислот, холестерина и ретинола, а также эстеразы у окуня *Perca fluviatilis*, судака *Sander lucioperca*, карася *Carassius auratus gibelio*, язя *Leuciscus idus* и карпа *Cyprinus carpio* был выявлен при pH 9.0 (Соловьев и др., 2015).

### **4.3. Влияние особенностей водоема на pH зависимость пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса, кишечной и ассоциированной микробиоты**

Как известно, белки, доминирующие в пище большинства видов рыб (Love, 1970, Shulman, Love, 1999; Кузьмина, 2005), деполимеризуются пептидазами, синтезированными их пищеварительной системой (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Bakke et al., 2011). Однако, как указывалось в первой главе, в последние годы механизмы процессов пищеварения были существенно пересмотрены. Было показано, что в деградации пищи важную роль играют ферменты объектов питания, которые участвуют в процессах индуцированного аутолиза, а также ферменты энтеральной микробиоты, реализующей симбионтное пищеварение (Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2000, 2005, 2015; Кузьмина и др., 2016).

Несмотря на исключительно важную роль ферментов микроорганизмов, реализующих симбионтное пищеварение, в том числе гидролиз специфических компонентов (Лубянскене и др., 1989, Шивокене, 1989; Gatesoupe et al., 1997; Kuz'mina, 2008; Кузьмина, 2015), их вклад в процессы пищеварения рыб до сих пор не оценен. Также до последнего времени были слабо изучены характеристики ферментов химуса, реализующих начальные стадии гидролиза различные компоненты пищи в полости кишечника рыб. В то же время они могут значительно отличаться от характеристик ферментов, локализованных на структурах слизистой оболочки, поскольку в химусе присутствуют ферменты объектов питания рыб и энтеральной микробиоты (Kuz'mina, 2008). В связи с этим ниже приведены данные, позволяющие сопоставить влияние pH на амилолитическую

и протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника, химуса и микробиоты у рыб, отличающихся по типу питания.

Данные по влиянию условий среды обитания на рН зависимость гидролаз, функционирующих в кишечнике рыб из водоемов, расположенных в разных географических зонах, опубликованы лишь недавно (Kuz'mina et al., 2011, Кузьмина и др., 2014 а, б; 2015 а, б, 2016 а, б; Золотарева и др., 2013, 2015). Ниже представлены результаты исследований, проведенных совместно с Г.В. Золотаревой на Рыбинском и Кучурганском водохранилищах, а также на р. Днестр, значительно различающихся по гидрологическим и биологическим параметрам.

#### **4.3.1. Влияние рН на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб из разных водохранилищ**

Поскольку до начала наших работ влияние рН на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб из разных водохранилищ не исследовалось, ниже будут подробно описаны полученные материалы. Объектами исследования были гидробионты из Рыбинского (57°С. ш., 39 °в.д., Россия) и Кучурганского водохранилища (46°С. ш., 30 °в.д., Молдова) водохранилищ. рН зависимость пептидаз и гликозидаз была исследована летом у четырех видов рыб: бентофага-факультативного фитофага плотвы *Rutilus rutilus*, типичного бентофага леща *Abramis brama*, ихтиофага-факультативного бентофага окуня *Perca fluviatilis* и типичного ихтиофага судака *Sander lucioperca* из Рыбинского водохранилища. В этот же период было исследовано 5 видов рыб из Кучурганского водохранилища: карп *Cyprinus carpio*, карась *Carassius carassius*, судак, окунь и солнечник *Lepomis gibbosus*. Принципиальным отличием этой работы было изучение в идентичных методических условиях характеристик одних и тех же гидролаз у консументов, их потенциальных объектов питания и энтеральной микробиоты.

Выбор объектов исследования был обусловлен различиями в спектре питания рыб. Судак питается главным образом окунем, плотвой и собственной молодью. Окунь характеризуется смешанным типом питания (различные виды беспозвоночных и молодь рыб). Плотва потребляет бентос, планктон и растительность, некоторые особи – моллюсков, преимущественно дрейссену. Лещ питается зо-

обентосом, однако большая часть содержимого кишечника состоит из детрита (Poddubny, Galat, 1995). Солнечник, подобно окуню характеризуются смешанным типом питания. При этом рыбы из южного водоема имеют более благоприятные условия для питания. Так, общее количество и биомасса зообентоса (олигохеты, хирономиды и моллюски) к началу 2000-х годов в Кучурганском водохранилище составляли 9514 инд./м<sup>2</sup> и 792.5 г/м<sup>2</sup> соответственно (Филипенко, 2005). В Рыбинском водохранилище эти параметры составляли 7361 инд./м<sup>2</sup> и 13.0 г/м<sup>2</sup> (Щербина, 2009). При этом спектр питания ихтиофагов в Кучурганском водохранилище значительно шире, чем в Рыбинском водохранилище (Кузьмина и др., 2016 б).

Ниже приведены результаты экспериментов, проведенных совместно с Г. В. Золотаревой.

*Влияние рН на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофиты рыб из Рыбинского водохранилища.* Данные, касающиеся активности пептидаз слизистой оболочки кишечника, показывают, что у всех изученных видов ее уровень, как правило, значительно ниже по сравнению с химусом (Kuz'mina et al., 2011). Сравнение активности пептидаз различных препаратов в диапазоне рН от 5.0 до 10.0 показало, что максимальная активность не только у разных видов рыб, но и у рыб одного и того же вида, как правило, наблюдается при разных значениях рН (рис. 4. 2).

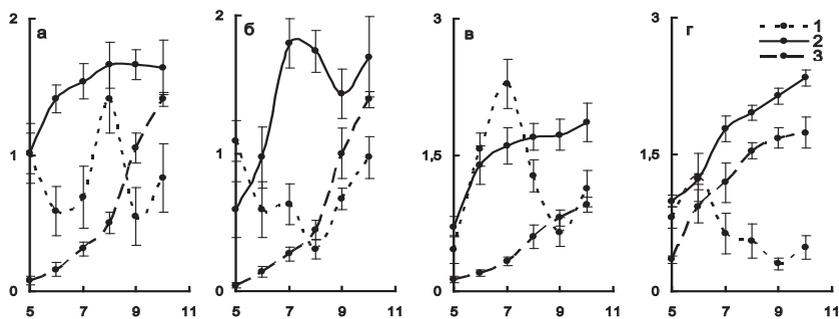


Рис. 4.2. Влияние рН на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофиты у рыб из Рыбинского водохранилища (по: Kuz'mina et al., 2011)

*Обозначения:* по оси абсцисс – рН, по оси ординат – активность пептидаз, мкмоль/(г • мин). 1 – микрофлора, 2 – химус, 3 – слизистая оболочка; а – лещ, б – плотва; в – судак, г – окунь

Нетрудно заметить, что оптимум pH пептидаз слизистой оболочки у всех видов рыб соответствует 10.0. Оптимум pH ферментов химуса у плотвы составляет 7.0, у леща – 8.0, у окуня и судака – 10.0. Наблюдаемые различия характеристик фермента вызывают значительные различия в соотношении ферментативной активности слизистой и химуса при разных значениях pH. Значения коэффициентов активность пептидаз слизистой оболочки /активность пептидаз химуса значительно варьируют. При этом максимальные значения у леща и плотвы превышают минимальные 11.7 и 10.1 раза соответственно, у окуня и судака – лишь в 2.3 и 3.6 раза соответственно.

Особенно важно отметить, что оптимум pH пептидаз энтеральной микробиоты у этих видов рыб имеет разные значения: у плотвы – 5.0, окуня – 6.0, судака – 7.0, леща – 8.0. При этом у леща оптимальные значения pH пептидазной активности одинаковы в случае энтеральной микробиоты и химуса (8.0), у окуня и судака – в случае слизистой оболочки и химуса (10.0). При pH 5.0 у плотвы, леща, окуня и судака активность составляет 100, 72, 66 и 20 %, тогда как при pH 10.0 – 89, 59, 38 и 50 % от максимальных значений соответственно. Интересно, что у бентофагов при pH 5.0 относительная активность пептидаз значительно выше, чем у ихтиофага судака (Kuz'mina et al., 2011).

*Влияние pH на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микробиоты.* Амилолитическая активность слизистой оболочки, химуса и кишечной микробиоты у разных видов рыб при одних и тех же значениях pH, как правило, также различна (Kuz'mina et al., 2011). Активность ферментов слизистой оболочки у всех видов рыб при pH 5.0 ниже, чем в химусе, в области pH 6.0–9.0 в большинстве случаев она близка (рис. 4.3).

Важно отметить, что зона высоких значений активности ферментов слизистой оболочки и химуса у судака уже, чем у леща и плотвы. Кроме того, форма кривой pH зависимости ферментов в случае слизистой оболочки была довольно близка, тогда как в случае химуса они всех видов рыб различна.

Если оптимум ферментов слизистой оболочки находится при pH 7.0, то химуса изменяется от pH 6.0 (у плотвы) до 8.0 (у леща). Различия в характере pH зависимости ферментов слизистой оболочки и химуса вызывают значительные различия в ве-

личине коэффициентов активность гликозидаз слизистой оболочки / активность гликозидаз химуса при различных значениях pH. У бентофагов, особенно у плотвы, в зоне низких значений pH, величина коэффициента выше, чем у ихтиофага судака, тогда как в зоне высоких значений pH она, напротив, ниже. Максимальные значения этого коэффициента превышают минимальные значения у плотвы, леща и судака в 1.5, 1.7 и 2.0 раза соответственно (Kuz'mina et al., 2011).

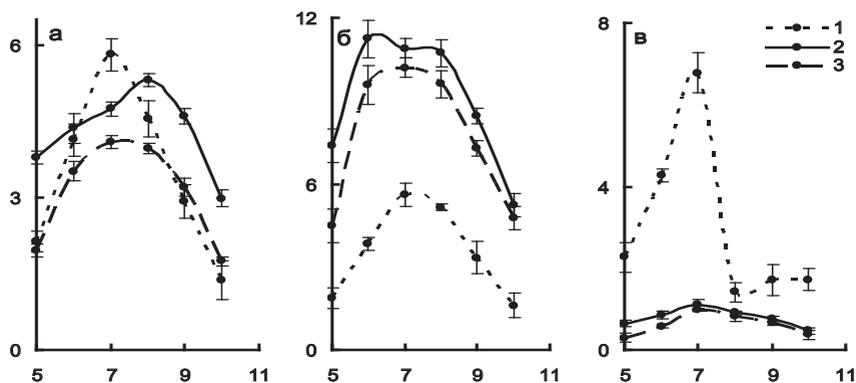


Рис. 4.3. Влияние pH на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофиты у рыб из Рыбинского водохранилища (по: Kuz'mina et al., 2011)

Обозначение, как на рис. 4.2. а – лещ, б – плотва; в – судак.

Оптимум pH амилолитической активности энтеральной микрофиты у различных видов рыб также находится при 7.0. У плотвы, леща и судака при pH 5.0 относительная активность ферментов составляет 33, 37 и 34 %, тогда как при pH 10.0 – 29, 24 и 25 % от максимального значения при pH 7.0 соответственно (Kuz'mina et al., 2011).

*Влияние pH на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса энтеральной микрофиты у рыб из Кучурганского водохранилища.* Данные по влиянию pH на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника показывают, что у всех изученных видов рыб минимум активности наблюдается при pH 5, максимум – при pH 10 (рис. 4.4).

Активность пептидаз химуса также увеличивается с увеличением pH. Относительная активность пептидаз химуса при pH 5.0 у карпа составляет 25 %, у солнечника 38–39 %, у карася, окуня и судака – 44 % от максимальной активности при pH 10. Более того, уровень активности пептидаз химуса у ряда видов рыб исключительно высок и при pH 7.0: у окуня – 100 % от максимальной активности, у карпа и карася – 73 % (Кузьмина и др., 2014 а).

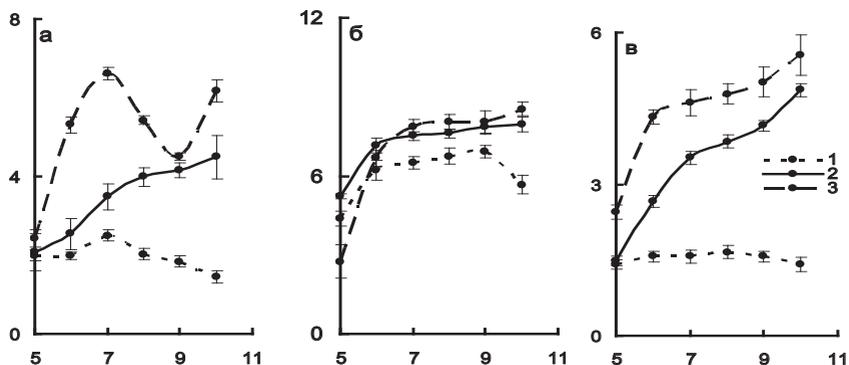


Рис. 4.4. Влияние pH на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у типичных и факультативных ихтиофагов из Кучурганского водохранилища (по: Kuz'mina et al., 2017)

Обозначения, как на рис. 4.2. а – окунь, б – солнечник; в – судак.

При изучении пептидазной активности энтеральной микробиоты обнаружены значительные межвидовые различия. Наиболее высокий уровень протеолитической активности у карпа обнаружен при pH 6, минимальный – при pH 10. У карася, напротив, максимальная активность фермента наблюдается в зоне щелочных значений pH (10). У судака активность пептидаз энтеральной микробиоты в диапазоне pH от 5 до 10 изменяется незначительно: минимальная активность составляет 85 % от максимальной активности. У солнечника минимальная активность составляет 60 % от максимальной при pH 9.0 (Кузьмина и др., 2014 а).

Характер pH-зависимости гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микробиоты у рыб из Кучурганского водохранилища значительно отличается от такового рыб Рыбинского водохранилища (рис. 4.5).

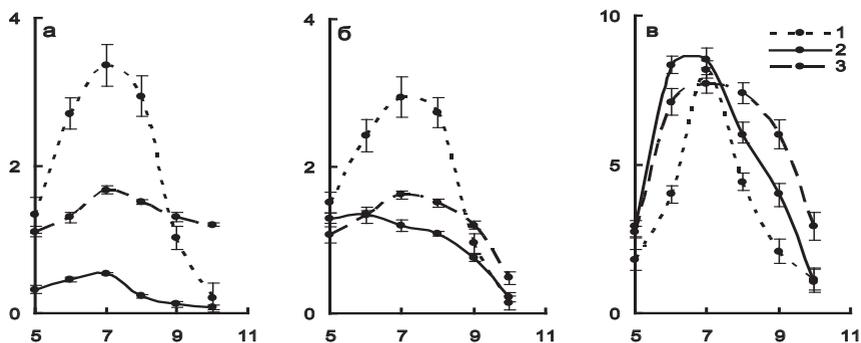


Рис. 4.5. Влияние pH на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофиты у типичных и факультативных ихтиофагов из Кучурганского водохранилища (по: Кузьмина и др., 2016 б)

Обозначения, как на рис. 4.2. а – судак, б – окунь в – солнечник.

Активность гликозидаз у бентофагов значительно выше, чем у типичных и факультативных ихтиофагов. Однако характер кривых температурной зависимости энтеральной микрофиты во многом похож (рис. 4.6).

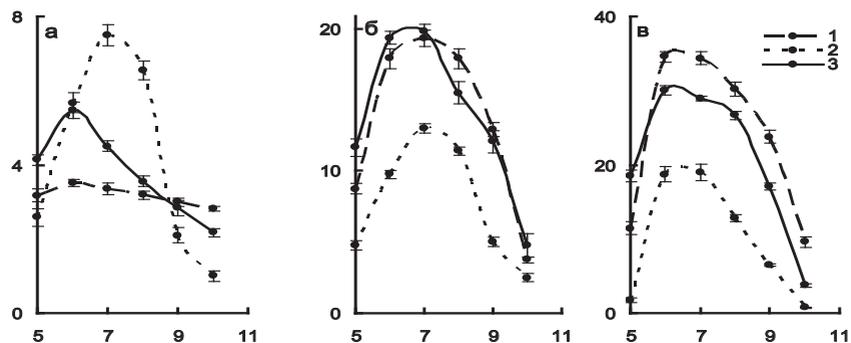


Рис. 4.6. Влияние pH на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофиты у бентофагов из Кучурганского водохранилища (по: Кузьмина и др., 2016 б)

Обозначения, как на рис. 4.2. а – лещ, б – карп в – карась.

Как показывают эти рисунки, оптимум pH гликозидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у большинства видов рыб

находится в зоне рН 6.0–7.0. У судака зона высоких значений ферментативной активности слизистой оболочки и химуса уже, чем у других видов рыб. Если оптимум рН гликозидаз слизистой оболочки и химуса чаще составляет 6.0, то оптимум рН гликозидаз энтеральной микрофиты у всех видов находится при рН 7.0. Уровень относительной активности гликозидаз энтеральной микрофиты при рН 5.0 минимален у карася, максимален у окуня (7.8 % и 51 % от максимальной активности).

При сопоставлении приведенных данных прежде всего следует отметить, что в обоих водоемах максимальная активность пептидаз наблюдается у типичных ихтиофагов, потребляла пищу с высоким содержанием белка, меньшую в факультативных ихтиофагов, минимальную – у планкто- и бентофагов, потребляющую пищу с высоким содержанием углеводов. В случае гликозидаз наблюдается противоположная тенденция (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 2008; Kuz'mina et al., 2017). Однако рыбы из Кучурганского водохранилища демонстрируют более высокую активность пептидаз по сравнению с таковой рыб Рыбинского водохранилища (Kuz'mina et al., 2017). В первую очередь это связано с различиями в температурном режиме водоемов. В то же время у исследованных рыб, несмотря на различия в температурном режиме водоемов и составе пищи, активность пептидаз содержимого кишечника выше по сравнению с таковой слизистой оболочки. Следовательно, гидролиз белковых компонентов пищи в полости кишечника у изученных видов рыб играет более важную роль, чем мембранный гидролиз. Различия в интенсивности гидролиза углеводных компонентов пищи за счет этих механизмов менее значительны.

Важно подчеркнуть общие закономерности, заключающиеся в различиях в характере рН зависимости пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофиты у рыб из разных водоемов. В наибольшей степени близка форма кривых рН зависимости пептидаз, локализованных на структурах слизистой оболочки кишечника рыб. В первую очередь это касается низкой активности пептидаз слизистой оболочки в зоне кислых значений рН и максимальной активности в зоне щелочных значений рН, а также оптимума рН гликозидаз при нейтральном значении рН у рыб из обоих водохранилищ. Высокие значения оптимума рН пептидаз слизистой оболочки и химуса обусловлены активностью трипсина, имеющего сходные величины

оптимума pH (Yoshinaka et al., 1984; García-Carreño et al., 2002; Nau, Benjakul, 2006). Низкая активность пептидаз в зоне кислых значений pH связана с тем, что у большинства видов рыб трипсин не устойчив при  $\text{pH} < 6$  (Jany, 1976; Pavlisko et al., 1999; Nau, Banjakul, 2006).

В то же время кривые pH зависимости пептидаз химуса у рыб из разных водоемов значительно различаются. При этом оптимум pH химуса совпадает с таковым слизистой оболочки только у желудочных рыб (окунь, судак), тогда как у бентофагов максимальная активность наблюдается при разных значениях pH. Поскольку pH зависимость пептидаз химуса в значительной степени зависит от соотношения количества ферментов, синтезированных рыбами, их жертвами и микробиотой, функционирующей в полости кишечника (Kuz'mina et al., 2011, 2017), различия характеристик могут быть обусловлены разным спектром питания рыб Рыбинского (Poddubny, Galat, 1995) и Кучурганского (Кузьмина и др., 2016 б) водохранилищ. При этом соотношение сериновых пептидаз и катепсинов, имеющих оптимум pH в кислой зоне (Barrett, Heath, 1977; Poole, De Duve, 1983; Ashie, Simpson, 1997; Wang et al., 2000) у разных видов гидробионтов может значительно различаться.

Различия pH зависимости пептидаз химуса у рыб от этих водоемов также могут быть обусловлены характеристиками энтеральной микробиоты, как индигенной, так и транзиторной, состав которой значительно зависит от его изменения в воде и пище (Buddington et al., 1997). У бентофагов количество и видовое разнообразие энтеральной микробиоты выше, чем у ихтиофагов (Зубкова, 1965, 1966). При этом наибольшая вариабельность характерна для рыб с широким спектром питания. Так, количество бактерий в 1 г сырого содержимого пищеварительного тракта кумжи *Salmo trutta*, питающейся как рыбой, так и ракообразными, варьирует от  $1.0 \times 10^3$  до  $22 \times 10^5$  клеток (Šyvokienė et al., 1997). Роль пептидаз энтеральной микробиоты особенно велика в зоне низких значений pH. При pH 5.0 активность пептидаз слизистой оболочки у бентофагов составляет около 5 % от максимальной активности, химуса – 30–50 %, энтеральной микробиоты – 70–100 %. Более высокая относительная активность пептидаз энтеральной микробиоты при низких значениях pH у бентофагов по сравнению с таковой у ихтиофагов, по-видимому, связана с наличием пепсиноподобных пептидаз. Эти данные

подтвердили предположение о том, что пептидазы энтеральной микрофиты способны компенсировать относительно низкую активность ферментов рыб при значениях рН, лежащих ниже их оптимума (Уголев, Кузьмина, 1993).

#### 4.3.2. Влияние условий среды обитания на рН зависимость пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофиты рыб из экосистемы р. Днестр

Влияние рН на активность пептидаз и гликозидаз, синтезируемых энтеральной микрофитой, и одноименных ферментов слизистой оболочки кишечника и химуса исследовали на примере карася *Carassius carassius* из разных участков р. Днестр: вблизи г. Тирасполь и устья реки. Размер рыбы, пойманной на разных станциях, был близок (около 30 см). При рН 7.0 активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микрофиты рыб в первом случае была значительно ниже, чем во втором (Кузьмина и др., 2014 а).

*Влияние условий среды обитания на рН зависимость пептидаз.* Характер рН зависимости пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб из разных участков р. Днестр был одинаковым – минимум при рН 5.0, максимум при рН 10.0. Оптимум рН пептидаз энтеральной микрофиты был значительно ниже (рис. 4.7).

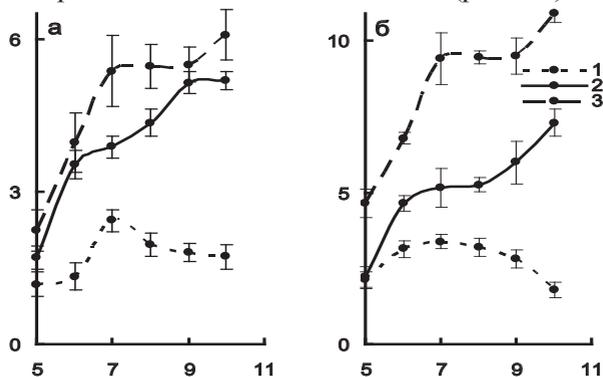


Рис. 4.7. Влияние рН на активность пептидаз энтеральной микрофиты, химуса и слизистой оболочки кишечника карася из р. Днестр вблизи г. Тирасполь (а) и из устья (б) (по: Кузьмина и др., 2014 а).

Обозначения, как на рис. 4.2.

Особое внимание следует обратить на различия в форме кривых рН зависимости, в частности величине оптимума рН пептидаз энтеральной микробиоты между рыбами из разных мест обитания. Действительно, оптимум рН у рыб с первой станции находится при рН 7.0, второй станции – в зоне рН 6.0–8.0. При этом в первом случае активность пептидаз энтеральной микробиоты резко возрастала при рН 7.0, во втором – не наблюдалось значительных изменений ферментативной активности в диапазоне рН от 6.0 до 9.0 (Кузьмина и др., 2014 а).

*Влияние условий среды обитания на рН зависимость гликозидаз.* Сравнение кривых рН зависимости одних и тех же препаратов позволило выявить различия характеристик слизистой оболочки кишечника и химуса (рис. 4.8). Так, оптимум рН в случае химуса у рыб, отловленных вблизи г. Тирасполь соответствует 6.0, в устье – 7.0, в случае слизистой оболочки, напротив, 7.0 и 6.0. Оптимум рН ферментов энтеральной микробиоты у рыб, отловленных в разных участках р. Днестр соответствует 7.0. Различия касаются не столько активности ферментов при оптимальных значениях, сколько при пограничных значениях (рН 5.0–6.0 и 8.0–10.0). При этом наблюдаются различия в пластичности между ферментами энтеральной микробиоты, участвующими в гидролизе белков и углеводов: характеристики пептидаз вариабельны, гликозидаз – постоянны.

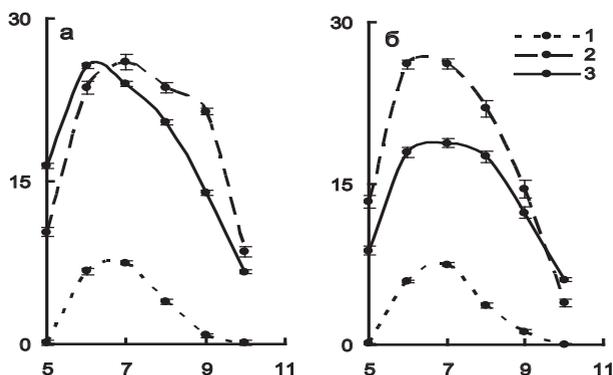


Рис. 4.8. Влияние рН на амилалитическую активность энтеральной микробиоты, химуса и слизистой оболочки кишечника караса из р. Днестр вблизи г. Тирасполь (а) и из устья (б) (по: Кузьмина и др., 2014 б)

Обозначения, как на рис. 4.2.

Представленные результаты показывают, что, несмотря на близкие размеры рыб, активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты при одинаковых значениях pH значительно варьирует, что хорошо согласуется с данными, полученными при исследовании рыб из Рыбинского водохранилища (Kuz'mina et al., 2011). Меньшая активность гидролаз у рыб из реки в районе г. Тирасполь может быть обусловлена различиями в температурном режиме, состоянии кормовой базы и воздействиями антропогенных факторов на пептидазы по сравнению с таковой рыб из устьевого участка. Определенную роль может играть и большая скорость течения (1.0–1.5 м/с) на первой станции по сравнению со второй станцией (0.4–0.9 м/с), а также меньшая степень минерализации воды – 343 и 725 мг/л соответственно (Зайца, 2000, Филипенко, 2005, Мелиян, Кожушко, 2012). При этом состав сточных вод Тирасполя оказывает более сильное влияние на протеолитическую, чем на амилитическую активность (Кузьмина и др., 2014 г). Также следует отметить, что воды на этих станциях содержат небольшое количество бактерий ( $2.75\text{--}4.40 \times 10^6$  клеток / мл) и классифицируются как слегка загрязненные.

Условия обитания в разных участках речной системы отражаются на особенностях характеристик энтеральной микробиоты у карасей из разных участков реки. Так, энтеральная микробиота у рыб из реки вблизи г. Тирасполь синтезирует преимущественно нейтральные пептидазы, у рыб из нижнего течения р. Днестр – весь спектр пептидаз. Эти данные подтверждают, что пептидазы различных микроорганизмов могут иметь максимальную активность, как при нейтральных, так и при слабощелочных значениях pH (Лубянской и др., 1989). Относительно высокая активность пептидаз энтеральной микробиоты при кислых значениях pH у рыб с первой станции указывает на наличие лактобактерий. Как указывалось ранее, бактерии рода *Lactobacillus*, включая *Lactobacillus casei casei* и *L. plantarum* из пищеварительной системы карпа, синтезируют трипсиноподобные и пепсиноподобные протеазы (Jankauskiene, Lesauskiene, 1995). По-видимому, различия в pH зависимости пептидаз микробиоты, выявленные у карасей из разных станций, объясняются различиями в видовом составе микробиоты и активности ферментов, синтезированных различными видами организмов.

Таким образом, исследования по протеолитической и амилолитической активности энтеральной микробиоты, слизистой оболочки кишечника и химуса у карасей из разных участков р. Днестр свидетельствуют о значительной изменчивости характера рН зависимости пептидаз микробиоты. Эффективность пептидаз энтеральной микробиоты из реки вблизи г. Тирасполь максимальна при рН 7.0, у рыб из нижнего участка р. Днестр (около устья) при рН 6.0–8.0. Оптимум рН амилолитической активности энтеральной микробиоты рыб, отловленных в разных участках р. Днестр, соответствует 7.0, причем форма кривых рН зависимости исключительно близка.

#### **4.3.3. Влияние условий биотопа на рН зависимость пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты рыб из Рыбинского водохранилища**

Приведенные выше данные по влиянию рН на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты свидетельствуют о значительных различиях характеристик ферментов (Kuz'mina et al., 2011; Кузьмина и др., 2014 а, б). Вариабельность характера рН зависимости пептидаз химуса и, особенно, энтеральной микробиоты свидетельствует о значительном влиянии на нее экологической составляющей (Кузьмина и др., 2014 а, б; Кузьмина и др., 2016 а, б). Доказательства влияния особенностей разных экологических зон водоема на рН зависимость пептидаз химуса и энтеральной микробиоты получены при исследовании ихтиофагов (налим *Lota lota*, щука *Esox lucius* и судак *Sander lucioperca*), обитающих в прибрежной, сублиторальной и батимальной зонах Волжского плеса Рыбинского водохранилища. Активность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты при рН 7.4 различна (табл. 4.6). Максимальная активность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника выявлена у типичного ихтиофага – щуки, меньшая – у ихтиофага-факультативного бентофага налима. Наиболее низкий уровень отмечен у пелагического ихтиофага – судака. Максимальная активность пептидаз слизистой у щуки выше, чем у налима в 2.1 раза, у судака – в 12.5 раза.

Таблица 4.6.

**Активность казеинлитических пептидаз  
слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты  
у рыб Рыбинского водохранилища при стандартной температуре  
20°C и рН 7.4 (по: Кузьмина и др., 2016 а)**

Виды	Активность казеинлитических пептидаз, мкмоль / (г • мин)			
	Слизистая	Химус	Сумма	Энтеральная микробиота
Судак	0.47 ± 0.08	1.65 ± 0.17 *	2.12	1.72 ± 0.20**
Щука	5.85 ± 0.32**	2.38 ± 0.12***	8.23	0.87 ± 0.17
Налим	2.80 ± 0.18**	2.74 ± 0.17**	5.54	1.75 ± 0.13**

Обозначения: различия статистически значимы при  $p < 0.05$  (ANOVA) \* относительно значений слизистой оболочки кишечника, \*\* относительно минимальных значений в столбце.

Различия между активностью пептидаз в химусе выражены слабее: максимальный уровень ферментативной активности у налима только в 1.7 раза превышает минимальный уровень у судака. У щуки активность фермента энтеральной микробиоты почти в два раза ниже, чем у судака и налима, в то время как у последних двух видов близка. Характер рН зависимости пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у изученных видов рыб различен (рис. 4.9).

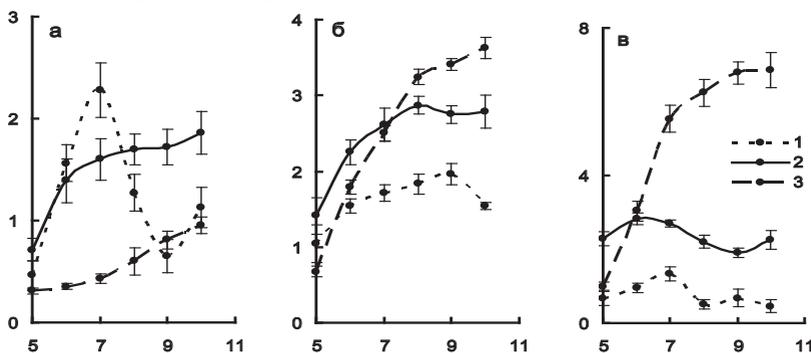


Рис. 4.9. Влияние рН на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты судака (а) налима (б) и щуки (в) из Рыбинского водохранилища (по: Кузьмина и др., 2016 а)

Обозначения, как на рис. 4.2. 1 – энтеральная микробиота, 2 – химус, 3 – слизистая оболочка.

Как показывает рисунок, у всех исследуемых видов рыб оптимум pH пептидаз слизистой соответствует 10, химуса щуки, налима и судака – 6, 8 и 10, энтеральной микробиоты – 7, 9 и 7 соответственно. При pH 5 относительная активность пептидаз слизистой оболочки у всех видов рыб составляет приблизительно 15 % от максимальной величины. Относительная активность пептидаз химуса и энтеральной микробиоты при pH 5 составляет 80 и 50 % у щуки, 50 и 52 % у налима и только 38 и 20 % от максимальной активности у судака соответственно. При pH 10 относительная активность пептидаз химуса варьирует от 77 % у щуки до 94 и 100 % у налима и судака. Относительная активность пептидаз энтеральные ферменты микробиоты варьирует от 35 и 50 % у щуки и судака до 77 % – у налима.

Прежде всего, следует отметить, что при стандартных условиях активность пептидаз слизистой оболочки кишечника и химуса (особенно у щуки и налима), как правило, близка обнаруженным ранее (Уголев, Кузьмина, 1993). Активность пептидаз энтеральной микробиоты у щуки в два раза ниже, чем у судака и налима (Кузьмина и др., 2016 а). Вполне вероятно, что последнее определяется спецификой экологических зон в водохранилище, в которых воспроизводятся и обитают эти виды рыб. Налим обитает в преимущественно придонных зонах сублиторали и батиаля, щука – в зарослях растений в сублиторали и литорали, а судак – в пелагиали (Поддубный, 1976). Кормовая база и микрофлора в этих зонах значительно различаются. Это следует учитывать в связи с тем, что состав и численность энтеральной микробиоты в значительной степени зависят от состава и численности микроорганизмов, обитающих в воде (Buddington et al., 1997; Ray et al., 2012).

Как указывалось выше, индигенная микробиота рыб образуется микроорганизмами, поступающими в пищеварительный тракт с водой и пищевыми продуктами на начальной стадии экзогенного питания; транзиторная (как правило, полостная) микробиота формируется на последующих стадиях онтогенеза (Kolkovski et al., 1993, 1997; Buddington et al., 1997; Кузьмина, Скворцова, 2002). В отличие от индигенной микробиоты, состав транзиторной микробиоты в значительной степени зависит от изменений в составе микроорганизмов в воде и объектах питания (Buddington et al., 1997).

Важно, что щука размножается и нагуливается в зоне защищённого побережья литорали, на микрофлору которого большое влияние

оказывает растительность. Судак и налим размножаются, а их сеголетки нагуливаются на разных участках сублиторали и батииали (Поддубный, 1971), придонные слои которых накапливают значительное количество разлагающегося органического вещества. Известно, что бактериальные сообщества водной толщи менее разнообразны по видовому составу по сравнению с таковыми донных отложений (Копылов, Косолапов, 2011). Об этом же свидетельствует более высокая численность и большее разнообразие кишечной микрофлоры у бентофага сазана *Cyprinus carpio*, чем у питающегося в толще воды ихтиофага судака (Зубкова, 1965, 1966). При этом состав микрофлоры у объектов питания бентофагов (водных беспозвоночных) в значительной мере определяется составом микробиоты грунта (Богатыренко, 2013). Это позволяет предположить, что состав и численность микробиоты, поступающей в пищеварительный тракт личинок исследованных видов рыб по пищевым цепям, различны. Молодь рыб, питающаяся в придонных слоях, особенно молодь налима, в отличие от молоди щуки может с представителями планктона и бентоса поглощать большое количество микроорганизмов, участвующих в разложении органического вещества. Это важно учитывать, так как активность пептидаз у представителей придонного планктона и бентоса сопоставима с таковой рыб (Кузьмина и др., 2016 б).

Вместе с тем наиболее интересно сопоставление влияния pH на активность пептидаз слизистой оболочки, химуса и энтеральной микробиоты у исследованных видов рыб. Оптимум pH пептидаз слизистой оболочки у всех видов рыб отмечен при 10, что совпадает с ранее полученными данными (Hidalgo et al., 1999; Kumar et al., 2007; Kuz'mina et al., 2011; Кузьмина и др., 2014 а, б). Значения активности пептидаз химуса, близкие к максимальным величинам, наблюдаются в более широком диапазоне значений pH. Необходимо напомнить, что в полости кишечника функционируют ферменты, синтезируемые не только поджелудочной железой и энтероцитами, но также объектами питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2000, 2005; Kuz'mina, 2008) и энтеральной микробиотой (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, Скворцова, 2002; Ganguly, Prasad, 2012; Ray et al., 2012). Сходные кривые pH зависимости пептидаз химуса и энтеральной микробиоты у налима свидетельствуют о значительном вкладе пептидаз энтеральной

микробиоты в активность ферментов, функционирующих в составе химуса (Кузьмина и др., 2016 б).

Значительная вариабельность pH зависимости пептидаз химуса и особенно энтеральной микробиоты рыб также подтверждает имеющиеся данные (Kuz'mina et al., 2011; Кузьмина и др., 2014 а). Важно отметить, что варьирует не только величина оптимума pH, но и относительная активность ферментов в зонах, лежащих за пределами оптимума. При этом обращает на себя внимание отчетливый оптимум pH пептидаз энтеральной микробиоты у судака и щуки (pH 7), а также исключительно высокая относительная активность пептидаз энтеральной микробиоты у налима в зоне pH 6–8 (>80 %). Одинаковый оптимум pH пептидаз энтеральной микробиоты у судака и щуки может быть обусловлен доминированием одного вида микроорганизмов или бактерий, обладающих пептидазами с близкими свойствами. Так, в одном из водохранилищ Чехии до 50 % бактерий принадлежит к группе  $\beta$ -Proteobacteria (Simek et al., 2005, цит. по: Копылов, Косолапов, 2011). Широкая зона оптимальных значений пептидаз энтеральной микробиоты, наряду со сходной pH-зависимостью пептидаз химуса у налима, может свидетельствовать о большем разнообразии видового состава микрофлоры, поступающей в кишечник с водой и пищей. Это предположение подтверждают сведения о большем разнообразии видового состава микробиоты донных отложений по сравнению с таковым пелагиали (Копылов, Косолапов, 2011) и большем разнообразии кишечной микрофлоры у бентофагов по сравнению с таковой ихтиофагов, питающихся в толще воды (Зубкова, 1965, 1966).

Высокие значения относительной активности пептидаз в зонах, лежащих за пределами оптимума pH, обнаружены при исследовании химуса: у судака при pH 8 сохраняется 90 % максимальной активности. Однако наиболее важно то обстоятельство, что максимальная активность ферментов химуса и энтеральной микробиоты наблюдается при низких и нейтральных значениях pH, которые чаще встречаются в кишечнике рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Более высокая относительная активность пептидаз энтеральной микробиоты при pH 5.0 у щуки и налима (50 и 52 %) по сравнению с таковой у судака (20 %), по-видимому, связана с участием пептидаз энтеральной микробиоты у первых двух видов в гидролизе белков при низких значениях pH. Высокий уровень относительной актив-

ности пептидаз энтеральной микробиоты и химуса в зоне низких значений pH у налима и щуки в отличие от пелагического хищника судака свидетельствует о том, что ферменты объектов питания и микрофлоры могут компенсировать низкую активность пептидаз, синтезируемых их пищеварительной системой.

Различия характера pH-зависимости пептидаз энтеральной микробиоты могут быть обусловлены как разным видовым составом, так и разным соотношением пептидаз, синтезируемых разными видами микроорганизмов. Представленные результаты свидетельствуют о том, что значительную роль в формировании видового состава, а, следовательно, и набора пептидаз, а также численности энтеральной микробиоты играют особенности экологических зон водоема (литораль, сублитораль и батиналь).

Таким образом, активность пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у исследованных ихтиофагов при одних и тех же значениях pH различна. Максимальная активность пептидаз слизистой оболочки и в большинстве случаев химуса наблюдается при pH 10, энтеральной микробиоты – при pH 7 и 9. Полученные данные подтверждают предположение о компенсаторной роли ферментов энтеральной микробиоты в процессах пищеварения рыб, степень выраженности которой в значительной мере зависит от особенностей экологических зон водоема (литорали, сублиторали и батинали).

#### **4.4. Влияние pH на активность ферментов потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты**

Как подчеркивалось выше, ферменты объектов питания рыб участвуют в деградации различных компонентов собственных тканей с помощью механизма индуцированного аутолиза и гидролаз энтеральной микробиоты, обеспечивающих симбионтное пищеварение (Уголев, 1985). Действительно, в XX в. был поставлен вопрос об участии экзоферментов жертвы в процессах пищеварения консументов (Jančařík, 1956, 1964; Dabrowski, Glogowski, 1977a, b; Lauff, Hofer, 1984; Munila-Moran et al., 1990). Позднее была доказана важная роль механизма индуцированного аутолиза, реализующегося с участием лизосомальных

гидролаз (Кузьмина, 2000, 2005, 2015). Вместе с тем влияние pH на активность ферментов во всем организме потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты было исследовано лишь в последние годы (Кузьмина и др., 2016 б; Kuz'mina, 2017).

#### **4.4.1. Влияние pH на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты**

При изучении этого вопроса особое внимание уделялось пептидазам, гидролизующим белки и пептиды, поскольку они играют решающую роль в циркуляции веществ в различных экосистемах. Наиболее подробно были исследованы пептидазы потенциальных жертв ихтиофагов, поскольку индуцированный аутолиз наиболее эффективен в кислой среде желудка (Уголев, 1985; Кузьмина, 2000). Было выявлено значительное влияние pH на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб (Kuz'mina, Ushakova, 2010, 2013). Однако в этом цикле работ, как правило, исследовалось влияние дискретных значений pH на активность пептидаз. Также важно, что помимо собственных ферментов, объекты питания привносят ферменты ассоциированной с ними аэробной и анаэробной микрофлоры (Кузьмина и др., 2016 б; Kuz'mina, 2017).

*Влияние pH на активность пептидаз у потенциальных объектов питания ихтиофагов.* Ниже приведены данные, касающиеся влияния pH на активность пептидаз тканей всего организма объектов питания рыб из Кучурганского водохранилища, а также выделенной из их микрофлоры. В качестве потенциальных объектов питания ихтиофагов исследованы тарань *Rutilus rutilus heckeli*, красноперка *Scardinius erythrophthalmus*, ерш *Acerina cernua*, бычок-песочник *Neogobius fluviatilis* (Золотарева, 2015; Кузьмина и др., 2016 б; Kuz'mina et al., 2017).

Было показано, что активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб и их микрофлора при одинаковых значениях pH, как правило, различна, а оптимум pH соответствует 8.0 или 10.0 (рис. 4.10). Как показывает рисунок, максимум активности пептидаз в организме плотвы и красноперки соответствует pH 10.0, у бычка-песочника и ерша pH 8.0. Кроме того, в пределах диапазона pH 8.0–10.0 активность

пептидаз у этих видов незначительно уменьшается (менее чем на 20 %) по сравнению с максимальной активностью. При pH 5.0 уровень активности ферментов у тарани, ерша и бычка-песочника достаточно высок (значения ниже максимума на 57, 51 и 28 % соответственно). Однако у красноперки при pH 5.0 активность пептидаз снижается на 89 %.

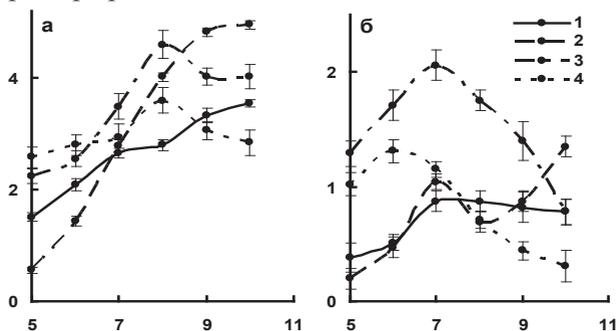


Рис. 4.10. Влияние pH на казеинлитическую активность пептидаз во всем организме потенциальных объектов питания ихтиофагов и ассоциированной микрофлоры (по: Кузьмина и др., 2016 б).

*Обозначения:* по оси абсцисс – pH, по оси ординат – ферментативная активность, % от максимума, а – рыбы, б – микробиота, 1 – тарань, 2 – красноперка, 3 – ерш, 4 – бычок-песочник

Различия в характеристиках пептидаз энтеральной микробиоты оказались более ярко выраженными. Оптимум pH пептидаз микрофлоры потенциальных жертв рыб варьирует в пределах 6.0–10.0. У красноперки оптимум pH пептидаз совпадает с таковым всего организма этого вида рыб (10.0). У тарани оптимум pH пептидаз ассоциированной микрофлоры находится в зоне 7.0 – 8.0, у бычка-песочника – при 6.0, тогда как у ерша – при 7.0. При pH 5.0 уровень активности ферментов у тарани, ерша и бычка-песочника составляет соответственно 44, 63 и 78 %, тогда как у красноперки – всего лишь 15 % от максимальной активности. При pH 10.0 активность микрофлоры у тарани, бычка-песочника и ерш уменьшается в 1.1, 2.6 и 4.2 раза, соответственно, по сравнению с максимальной активностью (Кузьмина и др., 2016 б; Kuz'mina et al., 2017).

*Влияние pH на активность пептидаз у потенциальных объектов питания планкто- и бентофагов.* В качестве потенциальных объектов питания бентофагов был исследован зоопланктон

(Dafniiformes, Copepoda и Ostracoda) и амфиподы Amphipoda sp., личинки хирономид Chironomus sp., олигохеты Oligohaeta sp. и дрейссена *Dreissena polymorpha* из Кучурганского водохранилища (рис. 4.11).

Полученные результаты демонстрируют помимо значительного сходства некоторые различия рН зависимости пептидаз у изученных видов гидробионтов с таковыми химуса у рыб. Максимальная активность пептидаз во всем организме зоопланктона выявлена в пределах рН 7.0–9.0, а у донных беспозвоночных – рН 6.0–8.0. При рН 5.0 активность пептидаз химуса у рыб разных видов может достигать 60 %, тогда как в тканях всего организма беспозвоночных – почти до 90 % максимальной активности (Kuz'mina et al., 2017). Различия в форме кривых рН зависимости пептидаз тех и других препаратов могут быть обусловлены как различным соотношением, так и различными характеристиками пищеварительных и тканевых гидролаз.

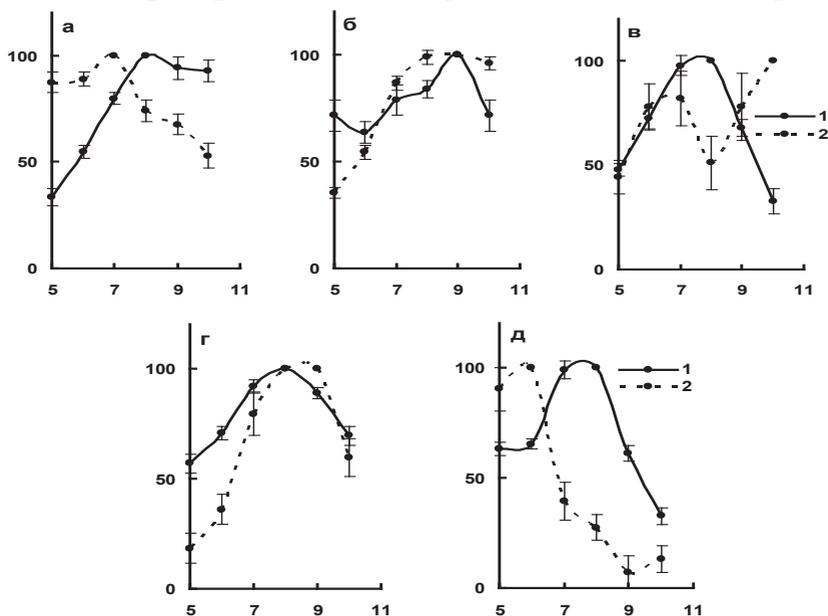


Рис. 4.11. Влияние рН на казеинлитическую активность пептидаз у некоторых видов беспозвоночных животных и сопутствующей микробиоты

(по: Кузьмина и др., 2016 б)

Обозначения: по оси абсцисс – рН, по оси ординат – ферментативная активность, % от максимума, а – бокоплав, б – зоопланктон, в – личинки хирономид, г – олигохеты, д – дрейссена (субстрат гемоглобин).

Действительно, в химусе преобладают трипсин и химотрипсин, тогда как во всем организме потенциальных жертв – пищеварительные гидролазы и катепсины (А, В, D, H, L и другие). Оптимум pH трипсина и химотрипсина находится в пределах 8.0–11.0 (García-Carreño et al., 2002; Kishimura et al., 2006, 2008; Kuz'mina et al., 2011, 2017), в то время как оптимум pH катепсинов обычно выявляется в диапазоне 3.0 – 6.5 (Ashie, Simpson, 1997; Wang et al., 2000; Высоцкая, Немова, 2008). Однако некоторые из них, в частности, катепсин H, сохраняют свою активность при нейтральных значениях pH (Wang et al., 2000). При этом на начальных стадиях пищеварения у рыб pH химуса может соответствовать 6.2–6.5 (Deguara et al., 2003; Marquez et al., 2012).

Также важно отметить, что отсутствие казеинлитической активности в тканях дрейссены, хорошо согласуется с данными, полученными ранее при исследовании различных видов моллюсков из Рыбинского водохранилища. При этом гемоглобинлитическая активность у дрейссены из Кучурганского водохранилища оказалась почти в 4 раза выше, чем у дейссены из Рыбинского водохранилища (Kuz'mina, Ushakova, 2013).

#### **4.4.2. Влияние pH на активность гликозидаз потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты**

Выше указывалось, что помимо собственных пептидаз, объекты питания привносят одноименные ферменты ассоциированной с ними аэробной и анаэробной микрофлоры (Кузьмина и др., 2016; Kuz'mina, 2017). В равной мере это относится и к ферментам, разрушающим углеводные компоненты пищи рыб.

*Влияние pH на активность гликозидаз у потенциальных объектов питания ихтиофагов.* У всех исследованных объектов питания ихтиофагов амилалитическая активность последовательно увеличивается в диапазоне pH от 5.0 до 7.0, а затем постепенно уменьшается. Примечательно достаточное сходство pH зависимости амилалитической активности у всех видов рыб: максимальная активность ферментов наблюдается при pH 7.0, минимальная – при pH 10.0 (рис. 4. 12). При этом в зоне низких значений pH (5.0) относитель-

ная активность ферментов колеблется от 29 % у бычка-песочника до 48 % у тарани. В зоне высоких значений pH (10.0) относительная активность ферментов колеблется от 15 % у бычка-песочника до 41 % у тарани.

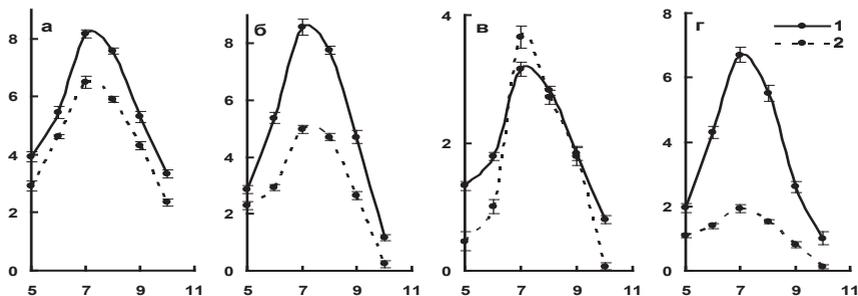


Рис. 4.12. Влияние pH на активность гликозидаз целого организма рыб и сопутствующей микробиоты (по: Кузьмина и др., 2015 б)

Обозначения, как на рис. 4.2. 1 – целый организм рыбы, 2 – микробиота. а – тарань, б – красноперка, в – ерш, г – бычок-песочник.

Однако в кислой среде желудка при pH 5.5 – 6.0, когда могут функционировать и лизосомальные гидролазы (Кузьмина, Цветкова, 2001, Высоцкая, Немова, 2008) и пищеварительные ферменты жертв (Кузьмина, Цветкова, 2001; Кузьмина, Голованова, 2004), ферменты ерша и бычка-песочника также эффективны. Важно отметить, что при pH 6.0 сохраняется 57 % (ерш) – 67 % (тарань) амилолитической активности по сравнению с таковой при pH 7.0. Следовательно, ферменты рыб – потенциальных объектов питания ихтиофагов могут эффективно деполимеризовать полисахариды в зоне кислых значений pH (Кузьмина и др., 2015 б; Kuz'mina et al., 2017).

*Влияние pH на активность гликозидаз у потенциальных объектов питания планкто- и бентофагов.* Несмотря на различия в уровне амилолитической активности у разных беспозвоночных (Голованова, 2000; Kuz'mina et al., 2011; Кузьмина и др., 2016 б), закономерности влияния pH на ферментативную активность, в том числе на форму кривых pH зависимости, независимо от их таксономического положения, достаточно близки (рис. 4.13). Как показывает рисунок, максимальный уровень амилолитической активности у всех гидробионтов зарегистрирован при pH 7.0, минимальный –

при pH 10.0. В зоне низких значений pH (особенно при pH 5.0) в ряде случаев наблюдаются видоспецифичные различия pH зависимости, как у беспозвоночных, так и у ассоциированной микрофиты. У амфипод и олигохет, а также у их микрофиты, уровень относительной амилолитической активности (около 20 % и 40 % максимальной активности) при pH 5.0 близок. У зоопланктона и дрейссены относительная активность ферментов ниже, чем у ассоциированной микрофиты, у личинок хирономид – выше.

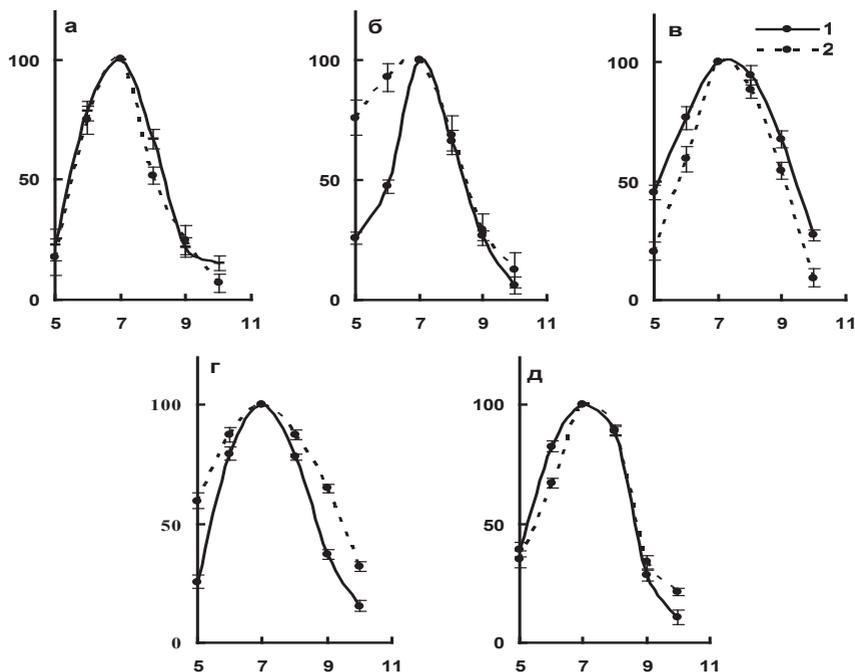


Рис. 4.13. Влияние pH на общую амилолитическую активность в организме некоторых видов беспозвоночных животных и сопутствующей микрофиты (по: Кузьмина и др., 2016 б)

Обозначения, как на рис. 4.11. 1 – беспозвоночные, 2 – микрофиты, а – бокоплав, б – зоопланктон, в – личинки хирономид, г – дрейссена, д – олигохеты.

Особого внимания заслуживает высокий уровень относительной активности гликозидаз у микрофиты зоопланктона (75% максимальной активности). Эти данные исключительно близки результатам исследования влияния pH на амилолитическую активность

энтеральной микробиоты рыб (Kuz'mina et al., 2011). Сравнение активности гликозидаз у микробиоты, ассоциированной с определенными видами беспозвоночных, позволяет выявить различия в зонах кислых и щелочных значений pH. Значения относительной амилолитической активности у микробиоты при pH 5.0 и 10.0 (относительно максимальной активности при pH 7.0) увеличиваются в ряду: амфиподы – 17.7 и 7.0 %, личинки хирономид. – 20.6 и 9.3 %, олигохеты – 35.1 и 21.3 %, дрейссена – 59.7 и 32.2 % соответственно. Особенно примечательно, что у видов *Dafniiiformes*, *Copepoda* и *Ostracoda*, входящих в суммарную пробу зоопланктона, относительная амилолитическая активность микробиоты при pH 5.0 составляет 75.7 %, а при pH 6.0 – 92.7 % от максимальной активности.

Следовательно, микробиота дрейссены и, особенно, зоопланктона может эффективно деполимеризовать полисахариды в зоне кислых значений pH. Выявленные различия в характере pH зависимости пептидаз и гликозидаз во всем организме потенциальных жертв рыб и ассоциированной с ними микробиоты несомненно влияют на вклад ферментов отдельных видов жертв в процессы пищеварения рыб.

#### **4.5. Сочетанное влияние температуры и pH на активность пищеварительных ферментов рыб и их объектов питания**

Традиционно влияние pH и температуры на характеристики ферментов рыб и их объектов питания исследуется отдельно. Вместе с тем в природных условиях температура и pH на организм гидробионтов действуют одновременно (Кузьмина, 1984, 2005; Munilla-Moran, Sabarido-Rey, 1996 a,b; Outzen et al., 1996; Кузьмина и др., 1999, 2004). Это обстоятельство нельзя не учитывать при оценке действия природных факторов на интенсивность гидролитических процессов, протекающих в пищеварительном тракте рыб. Однако сведения о сочетанном влиянии этих факторов на пищеварительные ферменты рыб и их объектов питания единичны. Так, при увеличении pH инкубационной среды от 7.0 до 9.0 зона оптимальных значений температуры трипсина селезенки длинноперого тунца *Thunnus tonggol*, расширяется, а трипсинов селезенки желтоперого *Thunnus albacares* и полосатого *Katsuwonus pelamis* тун-

цов, напротив, сужается (Klomkiao et al., 2004). Также показано, что при 30°C максимальная активность пептидаз желудка наблюдается при pH, близком к 2.0, в кишечнике – при pH 9.5–10.0. При увеличении температуры до 50°C, значения оптимума pH возрастают до 3.0 и 11.0 соответственно (Munilla-Morán, Sabarido-Rey, 1996).

При исследовании сочетанного влияния pH 3.0, 5.0 и 7.4, а также температуры 0, 10 и 20°C на гемоглоблилитическую активность пептидаз у дафний *Daphnia magna*, личинок хирономид *Chironomus sp.* и дрейссены *Dreissena polymorpha* выявлены видовые различия. Если увеличение температуры при одном и том же значении pH во всех случаях приводит к увеличению активности пептидаз, то при изменении значений pH эффекты неоднозначны. Так, у дафний при температуре 10°C максимум ферментативной активности отмечен при pH 5.0, при 0 и 20°C – при pH 7.4. У двух других видов наблюдается два «максимума» ферментативной активности (табл. 4.7).

Таблица 4.7.

**Влияние pH и температуры на активность гемоглоблилитических пептидаз в тканях потенциальных объектов питания типичных и факультативных планкто- и бентофагов (по: Кузьмина и др., 1999)**

Объект исследования	Температура, °C	Ферментативная активность, мкмоль(г • мин)		
		pH 3.0	pH 5.0	pH 7.4
Дафния	0	0.24±0.13	0.27±0.10	0.37±0.16
	10	0.41±0.10	0.67±0.19	0.57±0.12
	20	0.46±0.17	0.95±0.30	1.07±0.35
Личинки хирономид	0	0.43±0.08	0.21±0.08	0.69±0.19
	10	0.66±0.19	0.34±0.17	0.82±0.13
	20	0.88±0.22	0.46±0.16	1.98±0.32
Дрейссена	0	0.23±0.11	0.07±0.03	0.11±0.06
	10	0.37±0.14	0.11±0.02	0.29±0.17
	20	0.46±0.09	0.16±0.08	0.43±0.16

Несмотря на то, что катепсины проявляют максимальную активность в зоне низких значений, а катепсин D – при pH 3.0, в этих экспериментах независимо от таксономического положения гидробионтов в ряде случаев при pH 3.0 активность гемоглоблилитических

пептидаз была существенно ниже, чем при нейтральных значениях рН. Это, по всей вероятности, обусловлено наличием химоотрипсина в организме животных и пептидаз ассоциированной микробиоты.

Амилолитическая активность у тех же видов гидробионтов при снижении температуры от 20°C до 0°C (рН 7.4) уменьшается в 2–4 раза. Снижение рН до 5.0 при температуре 20°C обычно приводит к 2-кратному снижению активности гликозидаз. При сочетанном действии температуры и рН наиболее значительно уровень амилолитической активности снижается при сочетанном действии низкой температуры и кислых значений рН (в 2–5 раз), реже – под влиянием низкой температуры и щелочных значений рН (Кузьмина и др., 1999, 2004).

Важно отметить, что при изучении в аналогичных методических условиях моно- и бифакторного влияния температуры и рН на активность гликозидаз и казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника рыб были получены сходные результаты (Голованова, 1997; Кузьмина, 1997). Видовые особенности бифакторного воздействия температуры и рН на одноименные ферменты разных видов гидробионтов могут быть обусловлены не столько различиями в структуре ферментов, сколько различной конформационной пластичностью, а так же участием ферментов различных органов и тканей.

Интересно сравнить сочетанное действие рН и температуры на пептидазы кильки *Clupeonella cultriventris*, которая, будучи планктофагом-факультативным ихтиофагом, одновременно является объектом питания пелагических хищников. Действительно, пептидазы ее пищеварительного тракта обеспечивают деполимеризацию тканей жертв, а ферменты всех тканей участвуют в процессах индуцированного аутолиза. Важно, что повышение температуры от 0 до 20°C при рН от 3.0 до 5.0 приводит к увеличению активности гемоглобиналитических пептидаз, близких по значению таковым желудка, в 1.9 и 1.8 раза и к значительному (в 2.5 раза) увеличению в казеинлитической активности при 5.0 (Кузьмина, Ушакова, 2009). Помимо этого рН влияет на характер кривых температурной зависимости и величину  $E_{\text{акт}}$  пептидаз (табл. 4.8).

Особенно примечательна зависимость от рН величины  $E_{\text{акт}}$  пептидаз желудка по гемоглобину. По всей вероятности, у кильки, как у и сардины *Sardinops melanosticta* есть две молекулярные формы пепсина. Эффективному питанию кильки в характерных для осеннего и весеннего

периодов температурных условиях (не выше 10–12°C), наряду с высокой относительной активностью пептидаз желудка при 0–10°C, способствуют сравнительно низкие значения  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз. Следовательно, активность пищеварительных гидролаз в значительной мере зависит от сочетанного влияния рН и температуры.

Таблица 4.8.

**Величины энергии активации пептидаз в тканях кильки *Clupeonella cultriventris* (по: Кузьмина, Ушакова, 2009)**

Субстрат, рН	Энергия активации, ккал/моль		Точки перегиба, °С
	До 1-й точки перегиба	После 1-й/2-й точек перегиба	
Желудок			
Гемоглобин, 3.0	9.2	3.1/1.0	10 и 20
Гемоглобин, 5.0	9.5	6.8/4.6	10 и 30
Казеин, 5.0	14.4	8.5/7.9	10 и 30
Кишечник			
Гемоглобин, 7.4	7.0	6.9/5.0	10 и 30
Казеин, 7.4	7.4	5.4/1.0	10 и 30
Химус			
Гемоглобин, 7.4	4.5	1.8	30
Казеин, 7.4	7.2	3.6/1.1	10

#### 4.6. Заключительные замечания

Представленные данные свидетельствуют о том, что эффективность процессов пищеварения в значительной мере зависит от рН. Особое внимание следует уделить результатам, касающимся рН зависимости пептидаз и гликозидаз различного происхождения и локализации у рыб из Рыбинского и Кучурганского водохранилищ. Важно отметить, что максимальная активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у разных видов рыб находится при рН около 10.0. Максимальная активность пептидаз химуса наблюдается в более широком диапазоне рН. Различия рН зависимости пептидаз химуса у рыб разных видов, вероятно, связаны с тем, что ферментативная активность химуса при разных значениях рН определяется не только ха-

раактеристиками ферментов, синтезируемых поджелудочной железой, но и свойства ферментов жертв и кишечной микробиоты.

При этом важную роль играют различия в спектре питания различных видов рыб. Взрослые ихтиофаги питаются рыбой, бентофаги – беспозвоночными, в рационе ихтиофагов-факультативных бентофагов могут доминировать рыбы или беспозвоночные (Поддубный, 1976). Пища бентофагов в водоемах Верхней Волги состоит из более, чем 80 видов беспозвоночных; рацион ихтиофагов включает до 20 видов рыб (Иванова и др., 1978). Различия между видовым составом объектов питания бентофагов и ихтиофагов может приводить к изменению биохимического состава химуса и характеристик пептидаз.

Действительно, активность пептидаз во всем организме рыб значительно выше, чем у беспозвоночных (Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005, 2015). В процессах аутодеградации жертвы важную роль играют катепсины ее тканей, обеспечивающие процессы индуцированного аутолиза в зоне pH 3.0 – 6.0 (Кузьмина, 2000, 2005, 2015; Kuz'mina, 2008, 2017). По-видимому, различия в характере pH зависимости пептидаз химуса определяются различным соотношением различных катепсинов в тканях потенциальных жертв, а также составом энтеральной микробиоты. В последнем случае важную роль может играть разное соотношение одноименных ферментов, синтезированных различными видами микроорганизмов (Lubyanskene et al., 1989; Šhivokené, 1989; Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2005, 2015, Ganguly, Prasad, 2012). Как указывалось выше, композиция автохтонной (прикрепленной к слизистой оболочке) микробиоты относительно стабильна. Состав транзиторной (полостной) микробиоты в большей степени зависит от изменений ее состава в воде и пище (Buddington et al., 1997). При этом бентофаги характеризуются более высоким видовым разнообразием энтеральной микробиоты по сравнению с планктофагами и пелагическими хищниками (Зубкова, 1965, 1966, Кузьмина и др., 2016 б).

Также следует подчеркнуть вариабельность как оптимальных значений pH, так и относительной активности ферментов в зонах, лежащих за пределами оптимальных. Так, энтеральная микробиота леща из Рыбинского водохранилища сохраняет около 60 % максимальной активности пептидаз при pH 10.0. У энтеральной микробиоты окуня и судака эти значения ниже – 40 и 50 % максимальной

активности (Kuz'mina et al., 2011). Кроме того, важно, что при pH 5.0 относительная активность пептидаз энтеральной микробиоты выше у бентофагов, чем у ихтиофагов (плотва – 100, лещ – 70, окунь – 65, щука – 50, судак – 20, налим – 18 % от максимальной активности). Высокий уровень относительной активности пептидаз энтеральной микробиоты у бентофагов, вероятно, обусловлен отсутствием у них пепсинокислого пищеварения (Kuz'mina et al., 2011, 2017). По-видимому, у типичных бентофагов пептидазы энтеральной микробиоты, в частности *Lactobacillus* (Jankauskienė, Lesauskienė, 1995), выполняют функцию аспаргатных пептидаз желудка. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что пептидазы кишечной микробиоты способны компенсировать относительно низкую активность пептидаз, синтезированных пищеварительной системой рыб при низких значениях pH (Уголев, Кузьмина, 1993).

При изучении гликозидаз было показано, что характер кривых pH зависимости ферментов ихтиофагов достаточно близок (максимальная активность наблюдается при pH 7.0). Это может быть связано с преобладанием активности  $\alpha$ -амилазы. В то же время у бентофагов характер pH зависимости может определяться не только ферментами консумента, но и ферментами жертв, активность которых может быть выше, чем у рыб (Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005, 2015 а, б).

Также важно отметить, что виды, принадлежащие к зоопланктону и живущие в толще воды, имеют более низкую активность гликозидаз, чем представители донной фауны, обитающие в донных отложениях. Более высокая активность гликозидаз в организме представителей бентофауны, вероятно, обусловлена меньшей концентрацией кислорода в воде и, как следствие, значительной ролью анаэробных процессов у этих животных (Горомосова, Шапиро, 1989). При этом уровень активности гликозидаз не превышает 1.5 мкмоль/(г · мин) у микроорганизмов, ассоциированных с зоопланктоном, и изменяется в пределах 3–6 мкмоль/(г · мин) у микроорганизмов, ассоциированных с бентофауной. Эти различия, по-видимому, связаны с различиями в видовом составе микрофлоры в толще и в нижних слоях воды (Зубкова, 1965, 1966), а также в донных отложениях (Богатыренко, 2013).

Кроме того, следует обратить внимание на разную степень пластичности ферментов микробиоты, принадлежащих к разным цепям. Эти данные указывают на сходство характера влияния pH

на активность гликозидаз и различия в характере влияния рН на активность пептидаз, что демонстрирует больший консерватизм первых и высокую пластичность последних, что расширяет представления о масштабах адаптационных способностей пептидаз энтеральной микробиоты у рыб. Однако сравнение активности гликозидаз микрофлоры, связанной с тем или иным видом беспозвоночных, позволяет выявить различия в зоне кислых и щелочных значений рН. Так, значения относительной активности гликозидаз ассоциированной микробиоты при рН 5.0 и рН 10.0 составляют 17.7 и 7.0 для амфипод, 20.6 и 9.3 для личинок хирономид, а также 35.1 и 21.3 для олигохет от максимальной активности при рН 7.0. Особо следует отметить тот факт, что у представителей отр. *Dafniiiformes*, *Copepoda* и *Ostracoda* в общей пробе зоопланктона относительная активность гликозидаз микробиоты составляет 75.7 % при рН 5.0 и 92.7 % от максимальной активности при рН 6.0. Вследствие этого ассоциированная микробиота зоопланктона может эффективно деполимеризовать полисахариды в зоне кислых значений рН. Наконец, нельзя не отметить важное значение для процессов пищеварения сочетанного влияния рН и различных факторов среды обитания. В первую очередь это относится к сочетанному влиянию рН и температуры. Вместе с тем есть сведения о влиянии на рН зависимость ферментов солевого состава. Так, замена раствора Рингера, имеющего сложный солевой состав, на физиологический раствор, состоящий лишь из хлористого натрия, приводит к резкому сужению зоны оптимальных значений рН (Кузьмина, Неваленный, 1983).

Таким образом, имеющиеся данные расширяют представления об изменчивости активности пептидаз и гликозидаз различного происхождения и локализации в зависимости от рН окружающей среды. Показано сходство рН зависимости гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса, энтеральной микробиоты, потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной с ними микробиоты (максимум, как правило, при рН 7.0), а также значительная вариабельность рН зависимости пептидаз. Максимальная активность пептидаз слизистой оболочки и, как правило, химуса наблюдается при рН 10.0, максимальная активность микробиоты варьирует от рН 5.0 до 10.0. Эти данные подтверждают гипотезу о возможной компенсаторной роли ферментов жертв и микрофлоры в пищеварении рыб.

## **Глава 5. Влияние антропогенных факторов на активность и некоторые характеристики пищеварительных ферментов**

Известно, что водные экосистемы являются коллекторами многих видов загрязнения. При этом термическое загрязнение, закисление водоемов, а также токсичные промышленные отходы становятся факторами, влияющими на функционирование водных сообществ (Одум, 1986). Поскольку антропогенное воздействие на водные экосистемы приводит к сокращению биологических ресурсов, оценка их статуса и влияние токсических веществ на гидробионтов остаются основными задачами мониторинга состояния водоемов (Лукьяненко, 1983; Moore, Ramamoorthy, 1984; Флеров, 1989; Решетников, Шатуновский, 1997; Моисеенко, 2005; Немова, 2005; Комов, 2007). Главным источником загрязнения водоемов служат промышленные и бытовые стоки. Известно о воздействии загрязняющих веществ на поведение, питание, морфологию, биохимические и физиологические процессы, влияющие на размножение, развитие, рост, выживаемость и динамику численности популяций рыб (Лукьяненко, 1983; Неваленный и др., 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005; Микряков и др., 2001; Комов, 2007; Кузьмина, 2008). При этом загрязняющие вещества оказывают негативное воздействие на пищеварительную систему, в том числе ферменты рыб и их объектов питания (Alabaster, Lloyd, 1980, Мур, Рамамурти, 1987; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2008).

### **5.1. Краткая характеристика металлов, концентрация в воде и пище, пути поступления и влияние на организм рыб**

Металлы (в отечественной литературе тяжелые металлы), передающиеся по пищевым цепям, крайне медленно покидают биологический цикл. Концентрация металлов в организме пресноводных рыб может быть в 10–1000 раз выше, чем в водной среде (Eisler, 1971; Перевозников, Богданова, 1999). Токсические вещества, накапливающиеся в донных отложениях, могут быть источником вторичного

загрязнения. Вместе с тем, несмотря на значительный интерес исследователей к воздействию токсических веществ на ферментные системы разных органов и тканей рыб (Gill et al., 1991), сведения о влиянии приоритетных загрязнителей на пищеварительные гидролазы рыб ограничены. Наиболее изучены тяжелые металлы.

Существует два основных источника поступления металлов в водную среду: 1. антропогенное загрязнение, 2. вымывание горных пород и эрозия почвы. Значительное количество металлов накапливается в грунтах (Флеров и др., 2000). При этом масштабы антропогенного загрязнения могут быть сопоставимыми с масштабами геологических катастроф. Так, количество антропогенных выбросов ртути (Hg), составляющее 3000–5000 т в год, сопоставимо с таковым вулканической активности – 4000–5000 т в год (Комов и др., 2004). Детальное изучение содержания ряда металлов (Cu, Cd, Co, Mn, Ni, Sr, Cr и Zn) у сигов, обитающих в бассейне Северной Двины, позволило показать, что их содержание не зависит от близости к источнику антропогенного загрязнения. Это дало возможность предположить, что увеличение концентрации металлов может быть результатом не только элиминации из земной коры, но и аэротехногенного переноса (Баженова, 2003). Наибольшей биологической активностью, как правило, обладают ионные формы металлов и их липофильные комплексы. Загрязнение водной среды такими металлами, как Hg, Cd, Pb, Cu и Zn, является одним из наиболее распространенных видов антропогенного воздействия (Строгонов, 1968; Лукьяненко, 1983; Линник, Набиванец, 1986; Флеров, 1989, 2004; Моисеенко, 1999; Моисеенко и др., 2002; Неваленный и др., 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005; Nunes et al., 2014).

Масштабы антропогенного загрязнения водоемов варьируют не только в различных водоемах, но и в отдельных их участках. Так, содержание Zn в наиболее загрязненном участке Рыбинского водохранилища превышает таковое в чистом участке более, чем в 110 раз (Флеров и др., 2000). При этом степень влияния металлов на различные аспекты жизнедеятельности рыб зависит от целого ряда факторов (Лукьяненко, 1983, 1989; Флеров, 1989; Микряков и др., 2001). Известно о влиянии на токсичность металлов и их соединений жесткости и pH воды (Hansen et al., 2002; Straus, 2003) температуры (Грушко, 1979; Hansen et al., 2002), содержания кислорода (Грушко,

1979; Hammock et al., 2003), pH (Straus, 2003), а также синергизма и антагонизма ионов (Грушко, 1979).

*Краткая характеристика биогенных металлов.* Наибольшую опасность для гидробионтов представляют «тяжелые» металлы, имеющие плотность более  $5 \text{ г/см}^3$  и относительную массу атома, превышающую 40, особенно при залповых сбросах, приводящих к локальному увеличению их концентрации в воде. В последние десятилетия значительное внимание уделяется действию на рыб биогенных металлов, таких как Zn и Cu. Физиологическая роль Zn связана с деятельностью более чем 300 белков, в том числе ряда ферментов и гормонов, играющих важную роль в процессах питания, развития и роста. Cu необходима для процессов дыхания, питания, а также минерального и азотного обмена (Watanabe et al., 1997; Остроумова, 2001; Bury et al., 2003). Биогенные металлы, будучи незаменимыми, при определенных концентрациях становятся токсичными (Воробьев, 1979; Alabaster, Lloyd, 1980; Мур, Рамамурти, 1987; Sandheinrich, Atchison, 1989; Watanabe et al., 1997; Berntssen et al., 2003; Немова, 2005; Adams et al., 2010; Berzas Nevado et al., 2010; Authman et al., 2015). Несмотря на то, что  $LC_{50}$  Zn для рыб обычно составляет 0.5–5.0 мг/л, под действием различных физико-химических факторов среды этот диапазон может расширяться до 0.09–>100 мг/л (Мур, Рамамурти, 1987).

Концентрация Zn 15 мг/л смертельна для всех рыб в течение 8 ч. В мягкой воде токсичность Zn увеличивается, с повышением жесткости воды – понижается. При этом многие металлы могут накапливаться в тканях водных организмов и не подвергаются биодegradации (Alabaster, Lloyd, 1980; Farkas et al., 2003; Немова, 2005). Биологическая доступность и токсичность металлов зависят от формы (Кочарян, 2005). Так, двухвалентный ион Zn в водной среде часто образует тетра- и гексааквакомплексы (Дину, 2008). В пресной воде при  $pH > 4$  и  $< 7$  Zn существует главным образом как аква-ион (Spearg, 1981; Campbell, Stokes, 1985). При pH 6 преобладают растворенный Zn (98 %) и сульфат цинка,  $ZnSO_4$  (2 %). При pH 9 преобладают ионы моногидроксида (78 %), карбоната цинка,  $ZnCO_3$  (16 %) и свободные ионы (6 %). Аква-ионы наиболее токсичны, но их концентрация уменьшается с увеличением щелочности ( $pH > 7.5$ ) и солености (Spearg, 1981). В нейтральной среде большая

часть Zn связана с различными неорганическими и органическими соединениями и находится в осадках. Общая концентрация Zn в воде редко превышает 0.04 мг/л, в то время как в осадках может составлять 200 мг/кг (Eisler, 1993). При этом известно, что фульвокислоты усиливают миграцию металлов и уменьшают их токсичность, а гуминовые кислоты концентрирует металлы в донных отложениях и снижают их токсичность (Дину, 2008).

Накопление Cu в органах рыб наблюдается при ее концентрации в воде равной 10–20 мкг/л. В ряде случаев аккумуляция металлов в организме рыб может отражать их суммарную дозу в водоеме в течение длительного периода. Значения  $LC_{50}$  Cu для рыб в зависимости от условий среды обитания колеблются, как правило, в пределах 0.017–1.0 мг/л (Моисеенко, 1999). При этом у рыб разных таксономических групп значения  $LC_{50}$  могут существенно различаться: у представителей отр. Perciformes при 96 ч экспозиции  $LC_{50}$  варьирует от 0.66 до 2.55 мг/л, отр. Cypriniformes – от 0.023 до 1.76 мг/л, отр. Salmoniformes – от 0.025 до 1.1 мг/л в мягкой и жесткой воде соответственно (Pierce, Spear, 1979). При этом наиболее токсичны хлориды и нитраты Cu, вызывающие необратимые изменения уже в концентрации 0.01–0.02 мг/л. В мягкой воде токсичность Cu возрастает. В воде Cu в основном представлена в виде комплексов (Линник, Набиванец, 1986). Свободные катионы Cu преобладают при pH ниже 6.0. При pH 8.0 и выше преобладает гидроксид меди. Эффекты pH особенно важны в мягких и слабощелочных водах, поскольку в жесткой воде их активность уменьшается благодаря образованию комплексов с  $Ca^{2+}$  или  $CO_3^{2-}$  (Carvalho, Fernandes, 2006). В ряде случаев концентрация металлов в воде может быть значительной. Так, в воде р. Волга зарегистрировано увеличение концентрации Zn и Cu до 460 и 177 мг/л соответственно (Гапеева, 1993). В условиях аквакультуры Cu может поступать в пищеварительный тракт рыб с кормами, включающими продукты микробосинтеза. Так, в сухом продукте гаприна содержится до 300 мг/кг Cu, паприна – до 480 мг/кг Zn (Остроумова, 2001).

*Краткая характеристика неэссенциальных металлов (ртути, кадмия и свинца).* Hg и ее соединения, отличающиеся исключительной токсичностью и интенсивно накапливающиеся в некоторых компонентах водных экосистем, обладают высокой способностью

к миграции (Немова, 2005; Driscoll et al., 2013; Wiener, 2013). Значения ПДК Hg для воды водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 0.0001 мг/л (Перечень..., 1999). Hg поступает в организм гидробионтов преимущественно с пищей как в неорганической, так и в органической форме (Alabaster, Lloyd, 1980; Мур, Рамамурти, 1987; Bloom, 1992; Hall et al., 1997; Комов и др., 2004; Немова, 2005). Для Hg характерно образование металлоорганических соединений, таких как монометилртуть (MeHg,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), которое осуществляется микроорганизмами благодаря процессам метилирования (Ullrich et al., 2001). В естественных условиях более 90 % MeHg может попадать в организм рыб с пищей (Perrot et al., 2012; Driscoll et al., 2013). При этом MeHg, благодаря высокому сродству к липидам, легко перемещается через клеточные мембраны и изменяет клеточный метаболизм (Bloom, 1992; Hall et al., 1997; Vebianno et al., 2007), что делает ее в 10 раз опаснее неорганических форм металла (Немова, 2005).

Наибольший уровень MeHg наблюдается у хищных беспозвоночных и особенно у рыб, находящихся в конце трофической цепи (Kim, Burggraaf, 1999; Немова, 2005). В результате этого Hg может накапливаться в тканях рыб в значительных количествах (Kim, Burggraaf, 1999; Mason et al., 2000; Немова, 2005; Scheuhammer et al., 2007). Распределение Hg по органам и тканям рыб неравномерно: максимальное количество содержится в мышечной ткани, меньшее в печени и мозге рыб. Бенто- и планктофаги (плотва *Rutilus rutilus*, лещ *Abramis brama*, синец *Abramis ballerus*) накапливают металл менее интенсивно, чем ихтиофаги (окунь *Perca fluviatilis*, щука *Esox lucius*). Максимальное содержание Hg в мышцах окуня из водоемов северо-запада Европейской России (0.6–3.0 мг/кг сырой массы) отмечено для рыбы из озер Вологодской, Новгородской и Псковской областей. В частности, в мышцах окуня и щуки из этих водоемов содержание Hg может превышать 1 мг/кг сырой массы. Минимальное содержание Hg в мышцах (0.04–0.06 мг/кг сырой массы) отмечено у этих видов рыб из озер Владимирской, Костромской и Ярославской областей (Комов и др., 2004). В тканях пресноводных рыб в метилированной форме находится более 95 % ртути (Bloom, 1992). Аккумулируясь в тканях, она оказывает токсическое действие на различные процессы, протекающие в организме рыб (Alabaster, Lloyd, 1980; Мур, Рамамурти, 1987; Немова, 2005; Кузьмина, 2008).

Однако влияние на рост и выживаемость рыб наблюдается только при высоких концентрациях Hg в мышцах (6–20 мг/кг сырой массы), наблюдаемые у рыб из сильно загрязненных водоемов (Scheuhammer et al., 2007). При накоплении в мышцах Hg в концентрации 0.2–1.0 мг/кг сырой массы, металл вызывает функциональные нарушения в различных физиологических системах рыб (Adams et al., 2010). В частности, доказано влияние Hg на пищевое поведение рыб (Weis, Khan, 1990; Кузьмина и др., 2016). Под влиянием Hg интенсивность реакций поиска рыб может быть уменьшена из-за нарушения памяти и способности к обучению за счет снижения активности ацетилхолинэстеразы в головном мозге (Grippe and Heath, 2003).

Вместе с тем подавление половых гормонов, изменяющих репродуктивное поведение и нарушающих воспроизводство рыб, наблюдается при значительно меньших концентрациях MeHg (Scheuhammer et al., 2007). Детальное исследование развивающейся молоди плотвы *Rutilus rutilus* позволило обнаружить под влиянием Hg не только подавление роста, но и блокирование раннего онтогенеза, изменение лейкоцитарной формулы, гистопатогенез эритроцитов периферической крови и отклонение от нормы гистофизиологического состояния клеток паренхимы печени (Таликина и др., 2004). При исследовании окуня *Perca fluviatilis* выявлено как нарушение гистофизиологического состояния гепатоцитов, так и заторможенное развитие репродуктивных желез у самок, вплоть до тотальной дегенерации яичников (Таликина и др., 2006). При этом чувствительность гидробионтов к Hg выше таковой  $Cd = Cu > Zn > Pb > Co > Cr > As > Mn = Fe > Sn$  (Alabaster, Lloyd, 1980).

По чувствительности гидробионтов к металлам, Cd и Pb занимают 2-е и 4-е места после Hg и входят в группу наиболее распространенных и опасных в токсикологическом отношении элементов. Значения ПДК Cd для воды водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 0.005 мг/л, для Pb – 0.006 мг/л (Перечень..., 1999). Наиболее токсичны для рыб соединения Cd. Так, в случае  $CdCl_2$  гибель рыб может наблюдаться при концентрации 0.2 мг/л. При этом выявлены значительные видовые различия в величине токсической концентрацией Cd, которая в 7-дневных опытах для карпа *Cyprinus carpio* составляет 13, линия *Tinca tinca* – 15; ручьевой форели *Salmo*

*trutta fario* – 3 мг/л. У молоди карпа максимальное накопление Cd отмечено в почках, минимальное – в мышцах (Drastichova et al., 2003). Исследование содержания Pb в печени, жабрах, костной ткани, коже с чешуей и мышцах омуля *Coregonus autumnalis* селенгинской популяции оз. Байкал показало, что органом, наиболее подверженным накоплению металлов, является печень (Погодаева и др., 1998). Однако при исследовании хариуса *Thymallus thymallus* установлено, что максимальное накопление Pb наблюдается в чешуе, наименьшее в печени (Костицина и др., 2001). Содержание Pb в мышцах и печени пресноводных рыб из районов техногенного загрязнения может достигать 2–15 мг/кг (Перевозников, Богданова, 1999; Nduka et al., 2010; Askary Sary, Mohammadi, 2012).

*Содержание металлов в организме потенциальных объектов питания рыб разных экологических групп.* Многие гидробионты способны аккумулировать металлы пропорционально их концентрации в воде и пище (Roch, McCarter, 1984; Перевозников, Богданова, 1999; Соболев, 2006). Так, Zn и Cu аккумулируются потенциальными объектами питания рыб в значительных количествах (Kamunde et al., 2002., Simkiss, Taylor, 1989). При этом их концентрация в тканях рыб может быть на 1–3 порядка выше, чем в воде (Попов, 2001).

Способность гидробионтов к биоаккумуляции металлов зависит от видовых особенностей, а также от их содержания в объектах питания, воде и грунте (Кузьмина, 2008). Так, содержание Hg в мышцах рыб варьирует от 0.07 до 20 мг / кг сухой массы в зависимости от степени загрязнения водоема (Boudou et al., 1991). Сопоставление концентрации ряда металлов (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb и Zn) в целом организме и мышцах плотвы *Rutilus rutilus* и окуня *Perca fluviatilis* из бассейна р. Сена показало значительное превышение содержания всех металлов в целом организме. Наиболее значительное превышение отмечено для Mn, Zn и Fe – в 7.7, 4.9 и 3.8 раза соответственно (Chevreuil et al., 1995). При этом концентрация металлов в тканях молодых особей, как правило, в 1.5–4 раза выше, чем у взрослых особей (Погодаева и др., 1998). Однако есть сведения о том, что содержание металлов (Cu и Zn) в организме рыб (радужная форель *Oncorhynchus mykiss* и робало *Centropomus undecimalis*) положительно коррелирует с их длиной и массой (Marg et al., 1996; Joyeux et al., 2004).

Существует обширная литература, свидетельствующая о том, что интенсивность накопления металлов в разных тканях различна. Так, у мальков карпа максимальное накопление Cd отмечено в почках, минимальное – в мышцах (Drastichova et al., 2003). У ихтиофагов содержание Zn и Cu, как правило, выше в печени (24.1 и 15.3), у бентофагов – в мышцах (4.7 и 0.33 мг/кг сырого веса) соответственно. У планктофагов содержание металлов в печени ниже, в мышцах – сопоставимо с таковым у ихтиофагов (Соболев, 2006). Бóльшее количество металлов в печени и меньшее – в мышцах характерно для многих видов рыб (Kamunde et al., 2002; Bury et al., 2003; Mazon, Fernandes, 1999; Rashed, 2001). Наибольшее количество Cu, поступающей из воды, у прохилода *Prochilodus scrofa* аккумулируется печенью, в меньшей степени кишечником, почками и жабрами, в наименьшей степени – мышцами (Mazon, Fernandes, 1999). Аналогичные результаты получены при исследовании нильской тиляпии *Oreochromis niloticus* (Rashed, 2001), радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Kamunde et al., 2002), окуня *Perca fluviatilis* (Нюкканов, 2003, 2004) и карпа *Cyprinus carpio* (Kito et al., 1984). Изучение содержания металлов (Zn, Fe, Cu, Mn и Pb) в печени, жабрах, костной ткани, коже с чешуей и мышцах омуля *Coregonus autumnalis migratorius* селенгинской популяции оз. Байкал подтвердило, что органом, наиболее подверженным накоплению металлов, является печень (Погодаева и др., 1998). Однако судак *Sander lucioperca*, обитающий в р. Енисей, в большей степени накапливает Cu и, особенно, Zn в жабрах, чем в печени, селезенке и позвоночнике (Попов, 2001).

Поскольку основной вклад в общее содержание металлов в организме рыб вносят мышцы, следует отметить, что в ряде случаев их концентрация может быть достаточно высокой. Максимальная концентрация Zn зарегистрирована в мышцах судака *Sander lucioperca* из р. Волхов – 59 мг/кг сырой массы, Cu – в мышцах леща *Abramis brama* из Шекснинского водохранилища (18 мг/кг сырой массы), что значительно превышает допустимые остаточные концентрации – 40 и 10 мг/кг соответственно (Перевозников, Богданова, 1999). В ряде случаев максимальная концентрация металлов отмечена в чешуе и костных структурах рыб (Гапеева, 1993). Эти наблюдения подтверждены при исследовании леща *Abramis brama*: максималь-

ное накопление микроэлементов отмечено в чешуе или в костях, минимальное – в мышцах (Ширинкина, 2002). При исследовании хариуса, *Thymallus thymallus* также установлено, что максимальное накопление ряда металлов (Mn, Cu, Zn, Ni, Ti, Pb и Sr) наблюдается в чешуе, наименьшее – в печени (Костицина и др., 2001). Важно, что в чешуе фундулюса, *Fundulus heteroclitus* Zn колокализуется с фосфатом кальция  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , причем в лизосомах его концентрация выше, чем в окружающей цитоплазме (Sauer, Watabe, 1989). У карпа *Cyprinus carpio* наибольшее количество Zn найдено в тканях пищеварительного тракта (Sun, Jeng, 1999). Есть сведения о том, что наибольшее количество Сг находится в таких органах с активным метаболизмом, как глаза, мозг и сердце (Watanabe et al., 1997).

Несмотря на то, что беспозвоночные могут аккумулировать металлы пропорционально их концентрации в воде (Перевозников, Богданова, 1999), вариабельность аккумуляции значительна даже у таксономически родственных видов (Eisler, 1993). При этом содержание Zn и Cu в пробах зоопланктона варьирует в зависимости от особенностей водоема. Так, зоопланктон из оз. Балатон содержит 37.6 – 180.5 и 5.9 – 26.4 (Farkas et al., 2003), из озер Финляндии – 145 – 432 и 11 – 523 мг/кг сухого веса (Tulonen et al., 2006) Zn и Cu соответственно. В мягких тканях разных видов брюхоногих моллюсков содержание Zn и Cu также значительно варьирует: у *Brotia costula* – до 185 и 83, *Melanoides tuberculata* – до 127 и 115, у *Clithon sp.* – до 160 и 37 мг/кг сухого веса соответственно (Lau et al., 1998). В мягких тканях прудовиков *Lymnaea stagnalis* из пресноводных водоемов Украины концентрация Zn колеблется в пределах 40 – 140 мг/кг, Cu 1.7 – 57.6 мг/кг (Лукашев, 2008). Содержание Zn у брюхоногого моллюска *Haliotis diversicolor supertexta* колеблется от 50 до 100 мг/кг (Подгурская, Кавун. 2004). Концентрация Cu в почках мидий *Modiolus modiolus* составила  $21.2 \pm 11.2$  и  $1.8 \pm 0.5$ , *Crenomytilus grayanus*  $3.9 \pm 1.8$  и  $0.003 \pm 0.0008$  мг/г сухого веса соответственно (Liao et al., 2003). В то же время американские устрицы *Crassostrea virginica* могут содержать до 4 г Zn /кг сухой массы (Eisler, 1993). Согласно многолетним наблюдениям, средние значения концентрации Zn у личинок хирономид *Chironomus plumosus* не превышает 1 мг/кг, Cu и – 5 мг/кг сухой массы (Москвичева, 2002).

*Зависимость содержания металлов от абиотических и биотических факторов среды.* На содержание металлов в организме гидробионтов влияют температура, ионный состав и жесткость воды (Eisler, 1993; Pourang et al., 2004; Hansen et al., 2002; Straus, 2003), а также, сезон (Pourang et al., 2004, Sun, Jeng, 1999, Filazi et al., 2003), пол (Pourang et al., 2004; Thompson et al., 2002) и положение в трофической цепи (Kim, Burggraaf, 1999; Немова, 2005). Пул металлов в тканях, как упоминалось выше, может коррелировать с возрастом или размерами организма (Marr et al., 1996; Filipovic, Raspor, 2003). Наибольший уровень Hg, особенно MeHg, наблюдается у хищных беспозвоночных и, особенно, у рыб, находящихся в конце трофической цепи (Kim, Burggraaf, 1999; Mason et al., 2000; Немова, 2005). В зависимости от физико-химических особенностей водоемов и состава пищи концентрация Hg в тканях рыб может значительно варьировать (Сухенко, 1995; Комов и др., 2004). Так, содержание Hg в мышцах большеротого окуня *Micropterus salmoides* в одном из водоемов штата Юта (США) варьирует в пределах 0.3 – 7.3 мг/кг (Smith et al., 1974), в водохранилищах Южной Каролины – от  $0.7 \pm 0.09$  до  $4.5 \pm 0.2$  мг/кг (Abernathy, Sittel, 1977). Эти данные свидетельствуют о том, что содержание металлов в организме потенциальных объектов питания рыб разных экологических групп значительно варьирует и может превышать допустимые остаточные концентрации, особенно в водоемах, подверженных сильному антропогенному воздействию.

Хорошо известно, что избирательность аккумуляции рыбами поступающих с пищей различных металлов находится в зависимости от содержания в воде тех или иных соединений. В частности, степень накопления Fe и Mg в значительной мере зависит от наличия Zn, Mn, Cu, Pb и их концентрации в воде (Мудра, 2004). Показано, что Cd, Cr и Zn обычно поглощаются макроводорослью *Enteromorpha crinita* пропорционально их содержанию в воде. При этом аммоний и нитраты усиливают накопление Cr, снижая аккумуляцию Cd и Zn в организме питающегося ею фитофага пестряка *Siganus canaliculatus* (Chan et al., 2003). У радужной форели *Oncorhynchus mykiss* Ca, содержащийся в пище, снижает способность к аккумуляции Cd (Baldisserotto et al., 2004). Наличие в пище Na также может снижать интенсивность аккумуляции Cu в организме молоди радужной форели *Oncorhynchus mykiss*. При этом дли-

тельная экспозиция в условиях повышенного содержания Cu в воде, а также наличие Na в корме снижает аккумуляцию Cu в жабрах рыб, указывая на то, что эти металлы имеют общий механизм транспорта в жабрах (Kamunde et al., 2002; Pyle et al., 2003). Более того, при исследовании австралийской меланотении, *Melanotaenia nigra* показано, что многолетнее (более 40 лет) пребывание в среде с повышенной концентрацией Cu приводит к толерантности популяции к этому металлу (Gale et al., 2003).

Неблагоприятное действие металлов могут ослабить гуминовые кислоты, аминокислоты и взвешенные вещества, снижающие их аккумуляцию (Hammock et al., 2003). В частности, негативное действие Cd можно ослабить с помощью добавления в воду цеолита. При этом отмечается значительное снижение содержания металла в воде вследствие связывания его с цеолитом и более быстрое его выведение из организма рыбы (James, Sampath, 2000). Аналогичный эффект оказывает органический углерод. При исследовании миноги, *Pimephales promelas* и паралихта, *Paralichthys olivaceus* показано, что с увеличением концентрации общего органического углерода аккумуляция тканями Cu значительно снижается (Sciera et al., 2004; Zhao et al., 2004).

Содержание металлов в органах и тканях рыб с разным типом питания может различаться более чем на порядок. При этом имеет значение скорость обменных процессов, пол и возраст гидробионтов. В ряде случаев большее накопление токсических элементов отмечено у рыб-бентофагов (Евтушенко, Данилко, 1996), в ряде случаев – у ихтиофагов (Соболев, 2006) по сравнению с планктофагами. Кроме того, установлена прямая зависимость между содержанием металлов в донных отложениях и в тканях рыб (Тарбенюк и др., 2004). Также известно о сезонных изменениях содержания металлов, которые могут быть обусловлены как неравномерностью поступления металлов в водоемы в различные сезоны года, так и разной эффективностью детоксикации в организме рыб в условиях сублетального загрязнения (Кашулин, 2000; Кашулин, Терентьев, 2004).

Однако интенсивность накопления металлов в разных тканях может быть различной не только в разные годы, но в один и тот же сезон. Так, в 1999 г. у леща *Abramis btrama* их максимальное накопление отмечено в чешуе, в 2000 г. – в костях (Ширинкина, 2002).

На примере кефали, *Mugil auratus* показано, что наивысшие концентрации Cu наблюдаются в августе, наименьшие – в мае (Filazi et al., 2003). Важно отметить, что увеличение температуры не всегда приводит к увеличению эффективности аккумуляции металлов. Так, снижение температуры от 25 до 15°C не влияет на эффективность аккумуляции карпом *Cyprinus carpio* Cd, но приводит к снижению аккумуляции Zn из пищи. В этой же работе показано, что количество пищи и голодание рыб не влияет на аккумуляцию Cd, но значительно снижает эффективность аккумуляции Zn в условиях питания рыб *ad libitum*. При этом Cd более эффективно аккумулируется при потреблении личинок хирономид, чем олигохет и моллюсков (Van Campenhout et al., 2007). Комплексное исследование содержания металлов в органах и тканях малотычинкового сига *Coregonus lavaretus* и кумжи *Salmo trutta* оз. Чунозеро выявило их значительную вариабельность, обусловленную не только особенностями питания, но и особенностями функционирования механизмов экскреции и поддержания их уровня в организме (Королева, Терентьев, 2008).

*Механизмы детоксикации металлов.* У многих видов объектов питания рыб металлы связаны с низко- и высокомолекулярными белками, в том числе с металлотионеинами (МТ) и глутатионом (Коновалов, 2001; Столяр и др., 2003). В полости пищеварительного тракта рыб комплексы металлов с белками разрушаются, а освободившиеся ионы металлов в кишечнике соединяются с аминокислотами (преимущественно цистеином и гистидином) и другими соединениями, в составе которых транспортируются к эпителиоцитам. Связывание ионов таких металлов, как Cd, Cu и Zn, осуществляется при участии низкомолекулярных термостабильных белков, отличающихся большим содержанием цистеина – металлотионеинов (МТ) и глутатиона (Коновалов, 2001; Столяр и др., 2003; Pourang et al., 2004; Doering et al., 2015). Если количество металлов превышает связывающую способность белков, то они аккумулируются небелковыми соединениями (Столяр и др., 2003; Bury et al., 2003).

Известны две изоформы МТ (МТ-1 и МТ-2). При исследовании радужной форели *Salmo gairdneri* выявлены МТ с молекулярной массой <3, 11, 30 и >70 кДа. При этом Zn, поступающий в организм с пищей или водой, связывается преимущественно с низкомолекулярной фракцией (Spry, Wood, 1989). Первичная структура МТ из эксплан-

тов печени осетров (*Acipenser transontanus* и *Acipenser fulvescens*) подобна таковой других рыб и содержат структуры, необходимые для связывания металлов. Однако количество транскриптов МП в эксплантах печени видоспецифично: у первого вида увеличивается после воздействия Cd или Zn, но понижается после воздействия Cu, у второго после воздействия этих металлов не изменяется (Doering et al., 2015). При исследовании МТ в ткани карася, *Carassius carassius* и окуня *Perca fluviatilis* было показано, что они являются индуцибельными гетерогенными видоспецифичными белками (Нюкканов, 2004). Стимулирующая активность этих катионов уменьшается в следующей последовательности:  $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$  (Коновалов, 2001). При этом концентрация МТ коррелирует со степенью загрязнения водной среды (Roch, McCarter, 1984). При введении в рацион молоди атлантического лосося *Salmo salar* Cu в концентрации 5, 35 и 700 мг/кг сухого корма увеличение концентрации МТ в печени (в 3.5 и 89 раз) отмечено только для рыб, получавших два последних варианта корма (Berntssen et al., 1999). Помимо этого, ионные формы металлов могут связываться слизью (Kamunde et al., 2002). Эти данные свидетельствуют о том, что концентрация металлов в полости кишечника и на структурах энтероцитов зависит как от их содержания в воде и пище, а также скорости транзита через эпителиальный барьер, так и от состояния систем их детоксикации.

*Пути поступления в организм рыб и физиологическая роль биогенных металлов.* Известно, что Zn и Cu поступают в организм рыб главным образом с пищей (Harrison, Klaverkamp, 1989; Harrison et al., 1990; Berntssen et al., 1999; Handy et al., 2000; Kamunde et al., 2002; Bury et al., 2003). Абсорбция Zn доминирует в кишечнике (Handy et al., 2000; Bury et al., 2003; Kamunde et al., 2002). При этом возможно прямое взаимодействие эпителия пищеварительного тракта и пищеварительных ферментов с металлами. В ряде работ отмечается, что кишечник рыб является наиболее чувствительным органом к хроническому действию токсикантов, в частности Cd (Bay et al., 1990; Brown et al., 1990). Так, у радужной форели, *Oncorhynchus mykiss* максимальный уровень поглощения Zn в кишечнике соответствует 933 нмоль/(кг·ч), в жабрах – 240–410 нмоль/(кг·ч). Для Cu установлена зависимость путей поступления металла от содержания в корме – при высокой кон-

центрации с пищей поступает до 99 % металла (Bury et al., 2003; Kamunde et al., 2002), при низкой – до 60 %. Cu аккумулируется через жабры (Bury et al., 2003).

В переднем участке кишечника всасывается Zn. Существует два механизма транспорта. Один механизм функционирует при низкой концентрации Zn, когда слизь, выделяемая бокаловидными клетками, переносит его к поверхности эпителия, увеличивая биодоступность. Другой (диффузионный) механизм функционирует при высокой концентрации Zn. В транспорте Zn принимают участие аминокислоты (главным образом гистидин), специализированные транспортеры Zn и кальциевые каналы. В цитоплазме избыточный цинк связывается с металлотионеинами, в то время как свободный Zn при помощи специализированного транспортера переносится через базальную мембрану в постэпителиальные слои (Bury et al., 2003). На примере клариевого сома *Ictalurus punctatus* показано, что Cu на 70 % всасывается в среднем и заднем отделе кишечника. Предполагается два основных механизма базолатерального транспорта меди в кишечнике рыб: один с участием АТФазы, другой – участием анионного котранспортера (Handy et al., 2000). При этом Cu, поступающая в клетки из просвета кишечника, связывается металлошаперонами, которые переносят ее к аппарату Гольджи, затем в составе везикул – к базолатеральной мембране и высвобождается при помощи экзоцитоза (Bury et al., 2003).

Ежедневная потребность в Zn колеблется между 15 – 30 мг/кг сухой массы корма, а его недостаток приводит к снижению темпов роста и повышенной смертности рыб (Ogino, Yang, 1978; Gatlin, Wilson, 1983; Остроумова, 2001; Bury et al., 2003). Потребность рыб в Cu – 1–9 мг/кг сухой массы корма (Остроумова, 2001; Bury et al., 2003). Допустимые остаточные концентрации металлов в мышцах рыб соответствуют 40 и 10 мг/кг влажного веса в случае Zn и Cu соответственно (Перевозников, Богданова, 1999). Снижение содержания металлов в пище в разной степени влияет на развитие разных видов рыб (Остроумова, 2001). Так, низкое содержание в корме форели *Salmo gairdneri* Cu (0.7 мг/кг) не оказывает влияния на рост, тогда как у карпа *Cyprinus carpio* и нильской тилапии, *Oreochromis nilotica* интенсивность роста снижается при концентрации металла 0.5 мг/л (Остроумова, 2001; Ali et al., 2003).

## 5.2. Влияние металлов на активность и характеристики пищеварительных ферментов рыб

Металлы, поступающие в воду в результате антропогенного загрязнения среды, аккумулируются гидробионтами и включаются в пищевые сети (Kumada et al., 1980; Harrison, Klaverkamp, 1989; Harrison et al., 1990; Brown et al., 1990; Матей, 1996; Соболев, 2006). Пища, загрязненная металлами, при поступлении в пищеварительный тракт рыб может оказывать негативное действие на пищеварительные ферменты. Поскольку поступление таких металлов, как Zn и Cu, в эпителий кишечника является пассивным процессом, а лимитирующим фактором является экстрюзия через базолатеральные мембраны (Handy et al., 2000; Clearwater et al., 2002), на структурах щеточной каймы энтероцитов может быть сосредоточено значительное количество металлов, способных модифицировать активность пищеварительных гидролаз.

*Влияния металлов на активность пептидаз пищеварительного тракта рыб.* В условиях *in vitro* активность пептидаз слизистой оболочки желудка у осетра *Acipenser güldtnstädti* в присутствии ряда металлов в концентрации 10 мг/л, как правило, снижается на 20–40 %, у белуги *Huso huso* – на 15–30 %. (Туктаров, 2002; Неваленный и др., 2003). Влияние Zn и Cu на пептидазы, функционирующие в кишечнике, у тех же видов рыб, более значительно – активность снижается на 50 и 60, а также на 70 и 80 % у белуги и осетра соответственно (Туктаров, 2002; Неваленный и др., 2003).

У пресноводных костистых рыб Zn и Cu также вызывают снижение уровня активности пептидаз пищеварительного тракта. При этом степень их влияния на ферменты, функционирующие в желудке и кишечнике, различна. В условиях *in vitro* Zn и Cu в диапазоне концентраций 0.1 – 50 мг/л (рН 2.0 – 3.0) лишь незначительно снижают активность гемоглобинлитических пептидаз слизистой оболочки желудка. У большинства видов (щука *Esox lucius*, судак *Sander lucioperca*, налим *Lota lota*) торможение не превышает 10–20 %, у окуня *Perca fluviatilis* ферментативная активность при максимальной концентрации металлов снижается на 25 % в случае Zn и на 55 % в случае Cu. В присутствии меньшей концентрации металлов (10 мг/л) у большинства видов рыб активность гемоглобинлитических пептидаз желудка снижается в пределах 10 % (Кузьмина и др., 2005).

Влияние металлов на активность казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, независимо от таксономической принадлежности вида, как правило, выражено сильнее, чем на активность пептидаз желудка. Zn и Cu наибольшее влияние на активность казеинлитических пептидаз кишечника также оказывают в концентрации 50 мг/л. У типичных и факультативных ихтиофагов (щуки, судака, налима и окуня) в присутствии Zn активность казеинлитических пептидаз снижается на 30–90 %, в присутствии Cu – на 35–95 %. У бентофагов (каarp *Cyprinus carpio*, лещ *Abramis brama*, плотва *Rutilus rutilus*, карась *Carassius carassius*) активность казеинлитических пептидаз снижается на 20–70 и 45–90 % в присутствии Zn и Cu соответственно (Кузьмина и др., 2005).

Различия в эффектах этих металлов на активность гемоглобинлитических пептидаз выражены слабее. У ихтиофагов в присутствии Zn при максимальной концентрации металлов активность снижается на 50–60 %, Cu – на 60–80 у бентофагов – на 50–60 % и на 70–100 % соответственно (рис. 5.1 и 5.2).

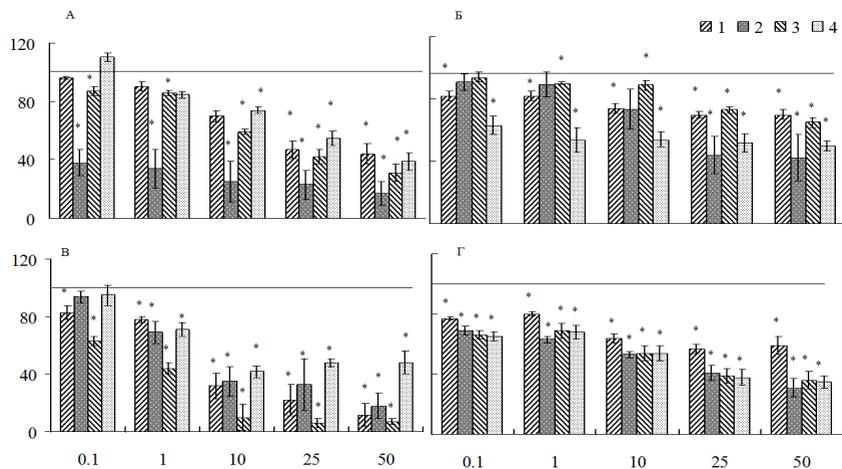


Рис. 5.1. Влияние цинка (1, 2) и меди (3, 4) на уровень активности казеин- (1, 3) и гемоглобинлитических (2, 4) пептидаз слизистой оболочки кишечника типичных и факультативных ихтиофагов, рН 7.4 (по: Кузьмина и др., 2005)

Обозначения: по оси абсцисс – концентрация металла, мг/л; по оси ординат – активность пептидаз, процент от контроля, принятого за 100. А – щука, Б – судак, В – налим, Г – окунь. \* –  $p < 0.05$ .

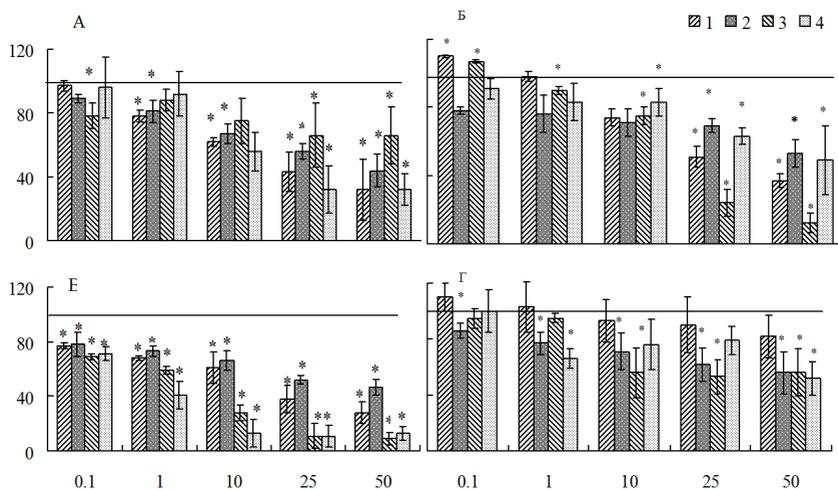


Рис. 5.2. Влияние цинка (1, 2) и меди (3, 4) на уровень активности казеинлитических (1, 3) и гемоглобинлитических (2, 4) пептидаз слизистой оболочки кишечника бентофагов, pH 7.4 (по: Кузьмина и др., 2005)

Обозначения, как на рис. 5.1. А – лещ, Б – плотва, В – карась, Г – карп. \* –  $p < 0.05$ .

Как показывает рис. 5.1., наиболее устойчивыми к действию металлов оказались казеинлитические пептидазы судака (максимальное снижение активности при максимальной концентрации Zn и Cu не превышает 30–35 %). У налима при высоких концентрациях металлов (25 и 50 мг/л) активность пептидаз снижается на 48 и 88 % в присутствии Zn и на 94 и 95 % в присутствии Cu. Гемоглобинлитические пептидазы судака также оказались наиболее устойчивыми к действию Zn и Cu – скорость гидролиза в присутствии максимальной концентрации металлов снижается на 58 и 50 % соответственно. У налима активность ингибируется на 80 и 50 % соответственно.

Помимо этого важно отметить разную степень воздействия этих металлов на одноименные гидролазы у рыб разных видов, а также вариабельность эффектов разных концентраций одного и того же металла. Так, у окуня уровень снижения ферментативной активности в присутствии Zn и Cu во всем диапазоне исследованных концентраций практически одинаков. У судака в случае больших концентраций металлов различия в степени снижения ферментативной активности недостоверны, при низких концентрациях действие Cu значительнее,

чем Zn. Ферменты щуки, напротив, в большей степени подвержены влиянию Zn. Для пептидаз налима характерно последовательное снижение скорости гидролиза гемоглобина в присутствии Zn (максимум на 82 %), большее, чем Cu (максимум на 58 %).

Данные, касающиеся активности казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника бентофагов, приведены на рис. 5.2. Как показывает рисунок, при концентрации металлов 50 мг/л активность казеинлитических пептидаз у карпа в присутствии Zn и Cu снижается на 72 и 91 %, у плотвы – на 63 и 88 %, у леща – на 68 и 34 % по сравнению с контролем соответственно. Ферменты карася отличаются наибольшей устойчивостью. При той же концентрации металлов ферментативная активность у карася в присутствии Zn и Cu снижается лишь на 18 и 44 % по сравнению с контролем. Активность гемоглобинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника у бентофагов близка таковой ихтиофагов. Наиболее подвержены действию Zn и особенно Cu пептидазы карпа и леща. Если в первом случае активность пептидаз в присутствии Zn и Cu (50 мг/л) снижается на 53 и 97 %, то во втором – на 56 и 68 % соответственно. Ферменты плотвы и карася отличаются несколько большей устойчивостью: активность пептидаз плотвы в присутствии Zn и Cu снижается на 47 и 51 %, карася – до 44 и 48 % соответственно.

Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что Zn и Cu в концентрации 10 мг/л, считающейся допустимой для пищевых продуктов (Перевозников, Богданова, 1999), у ряда видов рыб снижают активность казеинлитических пептидаз кишечника до 70 % (Кузьмина и др., 2005). Большая устойчивость сериновых пептидаз кишечника по сравнению с таковой аспартатных пептидаз желудка, по-видимому, обусловлена различиями в структуре их активных центров, а также особенностями взаимодействия ферментов и субстратов в средах с разными значениями pH (Антонов, 1983). Негативный эффект Zn и Cu на активность пептидаз кишечника рыб увеличивается, когда pH сдвигается в сторону кислых значений. Однако наиболее значительное снижение активности пептидаз наблюдается при сочетанном действии металлов, низких температур и кислых значений pH (Kuz'mina, Ushakova, 2010, 2013).

Вместе с тем в условиях, когда рыбы получают Zn и Cu с кормом (10, 50, 100 или 200 мг/кг), эффекты металлов на активность пептидаз выражены слабее, чем в опытах *in vitro*. При этом характер их

5.2. Влияние металлов на активность и характеристики пищеварительных ферментов рыб

влияния на активность казеинлитических пептидаз химуса и слизистой оболочки кишечника рыб близок и свидетельствуют о зависимости эффекта от концентрации металла. Однако в опытах *in vivo*, как и в опытах *in vitro*, под влиянием ионов Zn активность пептидаз снижается в меньшей степени, чем под влиянием ионов Cu. Ниже приведены данные, полученные совместно А. Ф. Тарлевой (табл. 5.1).

Таблица 5.1.

**Влияние цинка, поступающих с пищей, на активность пептидаз слизистой химуса и оболочка кишечника, рН 7.4**

Концентрация металлов в корме, мг/кг	Активность протеаз		
	Слизистая	Химус	
Контроль	0	$\frac{3.09 \pm 0.11}{100}$	$\frac{3.01 \pm 0.08}{100}$
Цинк			
Группа I	10	$\frac{3.27 \pm 0.27}{105.8(+5.8)}$	$\frac{3.21 \pm 0.06}{106.7(+6.7)}$
	100	$\frac{2.01 \pm 0.46^a}{65.1(-34.9)}$	$\frac{2.26 \pm 0.05^b}{75.1(-24.9)}$
	200	$\frac{2.03 \pm 0.38^a}{65.7(-34.3)}$	$\frac{2.10 \pm 0.06^b}{69.8(-30.2)}$
Группа II	10	$\frac{3.01 \pm 0.26}{97.4(-2.6)}$	$\frac{3.74 \pm 0.09^c}{124.3(+24.3)}$
	100	$\frac{2.84 \pm 0.24}{91.9(-8.1)}$	$\frac{3.29 \pm 0.08^a}{109.3(+9.3)}$
	200	$\frac{1.87 \pm 0.29^c}{60.5(-39.5)}$	$\frac{2.65 \pm 0.10^a}{88.4(-11.6)}$
Медь			
Группа I	10	$\frac{2.26 \pm 0.08^b}{73.1(-26.9)}$	$\frac{2.37 \pm 0.05^b}{78.7(-19.3)}$
	50	$\frac{2.27 \pm 0.08^b}{73.5(-26.5)}$	$\frac{1.79 \pm 0.05^b}{59.5(-40.5)}$
	100	$\frac{2.19 \pm 0.07^c}{70.9(-29.1)}$	$\frac{1.57 \pm 0.06^b}{52.2(-47.8)}$
Группа II	10	$\frac{2.88 \pm 0.07^a}{93.2(-6.8)}$	$\frac{2.51 \pm 0.10^c}{83.4(-16.6)}$
	50	$\frac{2.68 \pm 0.07^a}{86.7(-13.3)}$	$\frac{2.30 \pm 0.08^c}{76.4(-23.6)}$
	100	$\frac{2.61 \pm 0.06^a}{84.5(-15.5)}$	$\frac{1.97 \pm 0.03^c}{65.5(-34.5)}$

Примечание. Над чертой активность пептидаз, мкмоль/г•мин. «а» – различия достоверны  $p < 0.05$ , «б» – при  $p < 0.01$ , «в» – при  $p < 0.001$ . Под чертой активность пептидаз, % от контроля, принятого за 100. В скобках указан процент модификации («-») – торможение, («+») – стимуляция).

Как показывает таблица, у рыб группы I, получавших пищу, содержащую металлы в концентрации 10 мг/кг, в случае Zn активность пептидаз слизистой и химуса недостоверно повышается относительно контроля, в случае Cu – достоверно снижается. Важно отметить, что при увеличении дозы металла от 100 до 200 мг/кг активность пептидаз у рыб группы I достоверно не изменяется. У рыб группы II Zn в концентрации 10 мг/кг вызывает различные эффекты, причем активность пептидаз химуса достоверно увеличивается. Лишь максимальная концентрация Zn вызывает достоверное снижение уровня ферментативной активности, особенно в случае слизистой оболочки.

Под влиянием Cu активность пептидаз слизистой оболочки у рыб группы I, как правило, снижается в меньшей степени по сравнению с таковой химуса. Степень снижения активности пептидаз слизистой у рыб, получавших пищу, содержащую Cu в концентрации 10 и 50 мг/кг, близка. Активность пептидаз химуса последовательно снижается по мере увеличения концентрации металла. Увеличение концентрации Cu на порядок (от 10 до 100 мг/кг) в случае слизистой не приводит к значительному увеличению эффекта, в случае химуса наблюдается усиление эффекта. У рыб группы II введение в корм Cu не вызывает существенных изменений активности пептидаз слизистой оболочки с увеличением концентрации металла. Активность пептидаз химуса, напротив, последовательно уменьшается. Сравнение результатов исследования рыб, получавших одну или две дозы Zn, позволило выявить существенные различия во влиянии на активности пептидаз только в случае химуса: у рыб группы II наблюдается ослабление эффекта по сравнению с таковым у рыб из группы I. У рыб, получавших с пищей Cu, наблюдается та же тенденция. Однако в данном случае эта закономерность распространяется и на ферменты слизистой.

Важно отметить, что в опытах *in vivo* активность трипсиноподобных пептидаз снижалась в меньшей степени, чем в опытах *in vitro*. Так, в присутствии Cu в концентрации 50 мг/л в условиях *in vivo* активность трипсиноподобных пептидаз слизистой снижалась на 26.5, в опытах *in vitro* – на 95.2 %. Кроме того, в условиях *in vivo* выявлена меньшая зависимость эффекта металлов от их концентрации по сравнению с результатами опытов *in vitro*.

Выявленные различия объясняются различиями в составе инкубационной и энтеральной сред, в которых происходит взаимодействие металлов и ферментов (Кузьмина, 2016). Действительно, как указывалось выше, и в том, и в другом случае ионы металлов могут связываться с аминокислотами и белками, однако лишь в условиях *in vivo* происходит элиминация металлов. По-видимому, именно с этим может быть связано некоторое увеличение уровня активности пептидаз у рыб группы I в присутствии Zn. При этом поступающие в пищеварительный тракт активные ионные формы металлов могут избирательно связываться с аминокислотами и белками, находящимися в энтеральной среде (Бауман, 1977; Glover, Hogstrand, 2002), причем гистидин, цистеин и таурин способствуют повышенной аккумуляции Zn в форме хелатирующего комплекса в зоне щеточной каймы энтероцитов (Glover, Hogstrand, 2002). Значительное снижение активности пептидаз в присутствии металлов также может быть обусловлено их связыванием с регуляторными центрами, вызывающим изменение конформации ферментов. Наблюдающаяся в большинстве случаев более высокая относительная активность пептидаз у рыб группы II по сравнению с таковой группы I в присутствии обоих металлов может свидетельствовать о стимуляции защитных сил организма.

При этом возможно увеличение концентрации металлотионеинов, участвующих в детоксикации и выведении металлов из организма (Роева и др., 1999; Dang et al., 1999; Muto et al., 1999; Коновалов, 2001). Важно обратить внимание на то, что и в острых, и в хронических опытах активность пептидаз под влиянием ионов Zn снижается в меньшей степени, чем под влиянием ионов Cu. Это связано с тем, что индукцию синтеза металлотионеинов вызывает поступление в организм металлов, после чего их содержание в тканях возрастает, достигая максимума через несколько дней после начала контакта рыб с металлами (Роева и др., 1999). При этом индуцирующая способность у Zn выше, чем у Cu (Pourang et al., 2004).

Вместе с тем анализ имеющихся данных затрудняет то обстоятельство, что высвобождение металлов, поступающих с пищей, и переход в активное состояние происходит постепенно в процессе переваривания рыбой пищи. При этом высвобождающиеся из пищи ионные формы металлов, как указывалось выше, могут снова связываться с аминокислотами и белками. Также осложняет оценку

реального содержания металлов в полости кишечника разная скорость их рециклинга. В частности, после попадания Zn в пищеварительный тракт карпа его концентрация в химусе в течение 6 ч существенно снижается, в то время как концентрация Cu через 3 ч снижается, а через 6 ч снова возрастает (Яржомбек и др., 1980). Вместе с тем, независимо от условий экспериментов, оба металла, существенно снижая активность пептидаз, негативно влияют на усвоение рыбами белковых компонентов пищи.

Исследование влияния Cd в широком диапазоне концентраций (0.5 – 50 мг/л) на активность казеинлитических пептидаз слизистой у 12 массовых видов рыб Рыбинского водохранилища в условиях *in vitro* позволило выявить эффект лишь у двух видов рыб. При этом Cd лишь в максимальной концентрации (50 мг/л), характерной для чрезвычайных ситуаций, достоверно снижает уровень ферментативной активности на 30–40 % у щуки и *Esox lucius* налима *Lota lota* (Golovanova et al., 1999). Однако при хроническом действии Cd (5 мг/л) на ферменты слизистой оболочки кишечника тилапии *Oreochromis mossambicus* наблюдается снижение уровень активности казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, достоверное по сравнению с контролем на 15 и 60 сут. При этом рыбы через 1.5 мес. после начала эксперимента перестают питаться. Более того, ни одна особь не дожила до окончания эксперимента (120 сут.), несмотря на то, что через 60 сут. рыбы были помещены в чистую воду (табл. 5.2).

Таблица 5.2.

**Влияние кадмия на активность казеинлитических пептидаз, функционирующих в кишечнике тилапии в условиях хронического эксперимента, мкмоль/(г•мин) (по: Kuz'mina et al., 1999)**

Препарат	Продолжительность эксперимента, сут.					
	15	30	45	60	75	90
Контроль	9.95±1.21	6.9±0.5	9.2±0.8	8.7±0.3	9.0±0.8	10.3±0.4
Слизистая	<b>6.4±0.7</b>	5.4±1.0	7.1±0.5	<b>5.4±0.8</b>	6.7±0.9	7.3±1.4
Химус	<b>1.4±1.4</b>	1.45	Нет химуса	Нет химуса	Нет химуса	Нет химуса
Слизистая+Химус	<b>7.9±1.9</b>	6.8±2.0	7.1±0.5	5.4±0.8	6.7±0.87	<b>7.3±1.4</b>

*Примечание.* Жирный шрифт обозначает достоверность различий по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .

Близкие результаты получены при изучении в условиях хронического эксперимента влияния Cd на активность трипсина у мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* (Gupta, Sastry, 1981). В поведенческих опытах было установлено, что снижение в присутствии Cd интенсивности питания лебля *Abramis brama* обусловлено подавлением мотивационной составляющей (Герасимов и др., 1991).

При исследовании влияния Cd на активность казеинлитических пептидаз кишечника окуня *Perca fluviatilis* из нейтрального и кислого озер Дарвинского заповедника в условиях *in vitro* меньшие значения ферментативной активности выявлены у рыб из кислого озера. При этом наиболее значительное снижение ферментативной активности отмечено при исследовании химуса. Действительно, активность пептидаз слизистой оболочки снижается в 1.1 раза, активность пептидаз химуса – в 1.6 раза (табл. 5.3).

Таблица 5.3.

**Влияние кадмия на активность казеинлитических пептидаз кишечника окуня из нейтрального и кислого озер в условиях *in vitro*, мкмоль/(г·мин) (по:Kuz'mina et al., 2002)**

Озеро	Cd, мг/л	Слизистая оболочка	Химус	Слизистая + химус
1	0	5.26*0.51	7.46*0.71	12.72*1.22
	50	4.86*0.50	6.52*0.61	11.38*1.08
2	0	1.88*0.28	3.20*0.48 <sup>2</sup>	5.08*0.76 <sup>2</sup>
	50	1.67*0.27 <sup>2</sup>	2.00*0.33 <sup>1,2</sup>	3.67*0.60 <sup>2</sup>

Обозначения: 1 – нейтральное озеро, 2 – кислое озеро. <sup>1</sup> – различия достоверны между пробами с разным содержанием Cd (0 и 50 мг/л), <sup>2</sup> – различия достоверны между кислым и нейтральным озерами, p<0.05.

Также известно о значительном снижении активности трипсина слизистой оболочки кишечника под влиянием Hg (0.3 мг/л), содержащейся в воде, в условиях 30-суточной экспозиции мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* (Gupta, Sastry, 1981) и Cd (6.8 мг/л) (Sastry, Gupta, 1979). Однако при исследовании сеголетков карпа *Cyprinus carpio*, ежедневно получавших корм, содержащий ртуть в концентрации 0.66 мг/кг (в контроле 0.014 мг/кг), в течение 6 мес. не был выявлен пролонгированный негативный эффект (Кузьмина и др., 2013). Лишь в течение первых двух месяцев наблюдалось достоверное

уменьшение активности пептидаз слизистой оболочки кишечника у рыб опытной группы на 27 и 23 % (табл. 5.4).

Таблица 5.4.

**Влияние содержащейся в пище ртути на активность пептидаз  
слизистой оболочки кишечника карпа, мкмоль/(г•мин)  
(по: Кузьмина и др., 2013)**

Уровень активности пептидаз					
1	2	3	4	5	6
1.47 ± 0.03	1.66 ± 0.05	1.60 ± 0.05	1.64 ± 0.07	1.86 ± 0.16	1.87 ± 0.13
<b>1.07 ± 0.02</b>	<b>1.27 ± 0.10</b>	1.66 ± 0.07	1.68 ± 0.06	1.96 ± 0.12	<b>2.38 ± 0.04</b>

*Примечание.* 1 – 6 – месяцы. Верхние цифры – контроль, нижние – опыт. Жирным шрифтом выделены достоверные ( $p \leq 0.05$ ) изменения уровня активности пищеварительных ферментов у рыб опытной группы по сравнению с контролем.

В течение 3-х последующих месяцев различия между опытом и контролем исчезали. Через 6 мес. активность пептидаз достоверно превышала контроль на 27 %. Результаты эксперимента, проведенного совместно с А. Ф. Тарлевой, подтвердили тенденцию изменения характера динамики активности пептидаз (табл. 5.5).

Таблица 5.5.

**Динамика накопления ртути в органах пищеварительной системы  
сеголеток карпа и активности пептидаз**

Ткань	Сроки наблюдения, сут.			
	Контроль	14	28	42
Содержание ртути, мг/кг				
Кишечник	0.04±0.004	0.53±0.06	0.57±0.04	0.73±0.04
Гепатопанкреас	0.08±0.007	0.37±0.08	0.32±0.03	0.37±0.03
Активность пептидаз, мкмоль/(г•мин)				
Кишечник	6.57±0.08	4.04±0.09	8.28±0.16	10.03±0.20

Действительно, уровень протеолитической активности слизистой оболочки у рыб, получавших ртуть с кормом, через две недели снизился на 38.5 % по сравнению с контролем. В последующие сроки наблюдалось последовательное увеличение ферментативной

активности на 26 % и 52.7 %. Различия в степени и сроках влияния ртути в указанных опытах, по всей вероятности, обусловлены разным состоянием рыб (во втором опыте уровень активности изначально был в 4.5 раза выше, чем в первом). Таким образом, вопреки традиционному представлению о негативном действии ртути на различные процессы, возможен стимулирующий эффект на активность протеолитических ферментов у рыб.

*Влияния металлов на активность гликозидаз пищеварительного тракта рыб.* При исследовании влияния металлов на активность гликозидаз установлено, что характер и степень их воздействия также зависят от вида рыб, продолжительности экспозиции и концентрации токсиканта. Так, в условиях хронического эксперимента (30 сут) HgCl<sub>2</sub> в сублетальной концентрации (0.3 мг/л) не влияет на активность мальтазы и лактазы в желудке, пилорических придатках и кишечнике пятнистого змееголова *Channa punctata* (Sastry, Gupta, 1980), у мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* вызывает уменьшение их активности в кишечнике (Gupta, Sastry, 1981).

В условиях хронического действия Cd (0.25 мг/л) на карпа *Cyprinus carpio* наблюдается снижение активности α-амилазы, мальтазы и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника. Однако через 60 сут уровень активности ферментов приближается к контрольным значениям (Неваленный, Бедняков, 2004). При хроническом действии Cd (5 мг/л) на ферменты слизистой оболочки кишечника тилапии *Oreochromis mossambicus* также наблюдается снижение общей амилолитической активности. При этом величина эффекта зависит от времени экспозиции рыб. Реадаптация рыб к чистой воде не приводит к восстановлению ферментативной активности (Golovanova et al., 1994). Важно отметить, что устойчивость гликозидаз к Cd увеличивается с увеличением возраста рыб (Голованова, 2004).

В опытах *in vitro* также отмечено влияние металлов на уровень активности гликозидаз (Неваленный и др., 2003; Golovanova et al., 1994; Кузьмина, Голованова, 1997). Активность мальтазы слизистой оболочки кишечника белуги *Huso huso* в присутствии Zn и Cu в концентрации 10 мг/л снижается приблизительно на 10 %, осетра *Acipenser güldtstädti* – на 85 и 50 % соответственно (Неваленный и др., 2003). При исследовании влияния различных концентраций Zn и Cu (0.01 – 50 мг/л) на активность гликозидаз слизистой оболочки

кишечника у ряда видов пресноводных костистых рыб на фоне видовых различий выявлена большая токсичность Cu по сравнению с Zn. Амилолитическая активность в присутствии Zn (0.1 – 5 мг/л) у большинства видов рыб снижается в пределах 30 %, при концентрации 25 мг/л – в пределах 40 %. В присутствии Cu (0.1 – 10 мг/л) амилолитическая активность снижается до 40 %, при концентрации 25 мг/л – до 70 %. При низких концентрациях этих металлов в ряде случаев наблюдается увеличение ферментативной активности (Кузьмина и др., 2003; Голованова, 2004).

Исследование в идентичных методических условиях влияния Cd (0.5, 5, 25 и 50 мг/л) на уровень амилолитической активности слизистой оболочки кишечника у ряда видов рыб подтвердило зависимость эффекта от концентрации токсиканта и видовых особенностей рыб (Golovanova et al., 1999). Так, Cd в диапазоне концентраций 0.1 – 25 мг/л практически не влияет на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника у рыб, отловленных в зимний период. При концентрации Cd 25 мг/л снижение ферментативной активности на 22 % отмечено лишь у налима *Lota lota*. При более высокой концентрации (50 мг/л) амилолитическая активность снижается у налима, карася *Carassius carassius* и карпа *Cyprinus carpio* на 23, 26 и 29 % соответственно. Активность сахаразы при той же концентрации Cd снижается на 33 % лишь у синца *Abramis ballerus* (Golovanova et al., 1999).

При исследовании влияния Cd на активность гликозидаз кишечника окуня *Perca fluviatilis* из нейтрального и кислотного озера на фоне более низкой активности ферментов у рыб из кислотного озера выявлена разная степень влияния металла на одноименные ферменты химуса и слизистой оболочки кишечника (табл. 5.6).

Таблица 5.6.

**Влияние кадмия на амилолитическую активность и активность сахаразы кишечника окуня из нейтрального и кислотного озера в условиях *in vitro*, мкмоль/г мин (Kuz'mina et al., 2002)**

Озеро	Cd, мг/л	Слизистая оболочка	Химус	Слизистая + химус
Амилолитическая активность				
1	0	3.68 ± 0.08	3.27 ± 0.20	6.96 ± 0.25
	50	2.90 ± 0.10 <sup>1</sup>	2.43 ± 0.18 <sup>1</sup>	5.33 ± 0.20 <sup>1</sup>
2	0	2.80 ± 0.12 <sup>2</sup>	3.54 ± 0.16	6.33 ± 0.21
	50	2.45 ± 0.11 <sup>1,2</sup>	2.87 ± 0.14 <sup>1</sup>	5.32 ± 0.21 <sup>1</sup>

Озеро	Cd, мг/л	Слизистая оболочка	Химус	Слизистая + химус
Активность сахаразы				
1	0	0.45 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.82 ± 0.08
	50	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.75 ± 0.06
2	0	0.36 ± 0.02	0.48 ± 0.02 <sup>2</sup>	0.84 ± 0.04
	50	0.26 ± 0.03 <sup>1,2</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>2</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>1</sup>

Обозначения: 1 – нейтральное озеро, 2 – кислотное озеро. 1 – различия достоверны между пробами с разным содержанием Cd (0 и 50 мг /л), 2 – различия достоверны между кислотным и нейтральным озерами,  $p < 0.05$ .

Как показывает таблица, уровень активности гликозидаз слизистой у окуня из кислотного озера ниже, чем у рыб из нейтрального озера, химуса, напротив, выше. Cd оказывает меньшее влияние на активность гликозидаз по сравнению с таковой пептидаз. В случае амилотической активности более значительно под действием Cd снижается показатель слизистой и химуса у рыб из нейтрального озера (в 1.3 раза). Активность сахаразы химуса под действием Cd практически не изменяется, слизистой – уменьшается в 1.2 у рыб из нейтрального озера и в 1.4 раза у рыб из кислотного озера (Kuz'mina et al., 2002).

Сведений о влиянии Pb на активность гликозидаз крайне мало. В экспериментах *in vitro* исследовано влияние свинца Pb в форме азотной соли  $Pb(NO_3)_2$  в концентрации 0.01 – 25 мг/л на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника синца *Abramis ballerus*, леща *Abramis brama*, плотвы *Rutilus rutilus*, белоглазки *Abramis sapa*, судака *Sander lucioperca* и сома *Silurus glanis*. Для большинства исследованных видов рыб установлена низкая чувствительность гликозидаз к действию Pb. Наибольший эффект выявлен у леща: в присутствии металла в концентрации 10 и 25 мг/л амилотическая активность снижается на 18 и 27 % по сравнению с контролем соответственно. Однако при исследовании синца выявлен стимулирующий эффект при максимальной концентрации Pb (Голованова, Урванцева, 2014).

Также известно о значительном снижении активности амилазы и мальтазы, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника при действии  $HgCl_2$  в сублетальной концентрации (0.3 мг/л) в течение 30 сут. у мешкожаберного сома *Heteropneustes*

*fossilis* (Gupta, Sastry, 1981). При длительном воздействии Hg, поступающей с пищей в форме MeHg, отмечено достоверное снижение активности ферментов, осуществляющих гидролиз углеводов компонентов пищи в кишечнике у ряда видов пресноводных рыб (Голованова и др., 2002, 2008; Голованова, Комов, 2003, 2005). При изучении влияния Hg на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника сеголетков плотвы *Rutilus rutilus*, получавшей с пищей в течение 4-х мес. различные концентрации металла, в ряде случаев выявлено снижение амилолитической активности на 13 %, активности сахаразы – на 10–43 % (Голованова и др., 2008). При исследовании сеголетков карпа *Cyprinus carpio*, получавших корм с повышенным содержанием ртути (0.66 мг/кг и 0.014 мг/кг, в опыте и контроле соответственно) выявлено постепенное увеличение концентрации металла в мышечной ткани, которая через 6 мес. превышала таковую у контрольных рыб в 5.4 раза. При этом активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника, как и предыдущих опытах, как правило, снижалась (Кузьмина и др., 2013).

Важно отметить, что чувствительность гликозидаз к действию Zn, Cu и Cd с увеличением возраста рыб снижается. В летний период на фоне высокой функциональной активности пищеварительной системы чувствительность гликозидаз рыб к действию ионов тяжелых металлов возрастает. Хроническое действие Cd и Hg снижает скорость гидролиза углеводов и повышает чувствительность пищеварительных гликозидаз к действию ионов меди и цинка (Голованова, 2006).

*Влияние металлов на активность пищеварительных гидролаз у объектов питания рыб.* Прежде всего, следует отметить, что степень снижения активности пептидаз у рыб – объектов питания ихтиофагов, как правило, выше, чем у беспозвоночных. При этом в условиях *in vitro* казеинлитические пептидазы наиболее чувствительны к действию металлов у видов, относящихся к сем. карповых Cyprinidae. Так, в присутствии Zn (10 мг/л) у рыб этого семейства активность снижается максимум в 2 раза, у рыб сем. окуневых Percidae и сельдевых Clupeidae – в 1.3 раза, в присутствии Cu – в 2.4 и 1.7 раза соответственно. Активность гемоглобинлитических пептидаз под действием Zn снижается лишь в 1.5 раза, Cu – в 2.4 раза (Kuz'mina, Ushakova, 2010).

Степень снижения активности пептидаз у объектов питания планкто- и бентофагов под влиянием этих металлов также значительно варьирует. Так, активность казеинлитических пептидаз под действием Zn (10 мг/л) снижается на 15–30 % (суммарная проба зоопланктона, а также личинки хирономид *Chironomus riparius*, *Daphnia longispina*), Cu – на 20–40 %. Активность гемоглобинлитических пептидаз в первом случае уменьшается на 8–50 % (*D. longispina*, катушка *Planorbarius purpurea*), во втором – на 10–65 % (прудовик *Limnea stagnalis*, *D. longispina*). Степень воздействия металлов на активность пептидаз, функционирующих в целом организме объектов питания рыб, также зависит от температуры и pH среды. При этом в отличие от ферментов пищеварительного тракта рыб большую роль играет последний фактор. В частности, при снижении pH до 5.0 активность казеинлитических пептидаз у некоторых видов беспозвоночных и рыб уменьшается, в то время как активность гемоглобинлитических пептидаз, как правило, значительно возрастает, особенно в целом организме рыб при pH 3.0 (Kuz'mina, Ushakova, 2013).

Исследование в условиях *in vitro* влияния различных концентраций (0.01 – 50 мг/л) Cu, Zn и Cd на амилолитическую активность в тканях беспозвоночных (рачковый зоопланктон, личинки насекомых, моллюски) позволило выявить видовые различия в чувствительности гликозидаз к действию исследуемых металлов (активность снижается на 5–20 %). Максимальный тормозящий эффект Cu и Zn отмечен у моллюсков прудовика и катушки *Planorbis corneus*, минимальный – у личинок хаборуса *Chaoborus sp.* Cd в наибольшей степени снижает ферментативную активность у личинок хаборуса, в наименьшей – у дрейссены *Dreissena polymorpha*. Cu оказывает больший эффект по сравнению с Zn на гликозидазы зоопланктона, прудовика, личинок хаборуса и стрекоз. Минимальные концентрации Zn и Cu, при которых отмечено статистически достоверное снижение активности гликозидаз у беспозвоночных, близки к их фоновым концентрациям в природных водах, в то время как концентрации Cd значительно превышают их фоновые значения. Так, минимальная концентрация Zn, при которой отмечено достоверное снижение амилолитической активности, составила у катушки 0.01, у прудовика 1.0, у личинок хаборуса 25 мг/л, Cu –

у прудовика 0.01, у катушки 0.1 и у личинок хаборуса 50 мг/л (Голованова, Фролова, 2005).

Загрязнение вод металлами оказывает существенное влияние на активность щелочной фосфатазы и неспецифических эстераз сестона (планктонные организмы, а также частицы органической природы), участвующих в круговороте фосфора и углерода (Предеина и др., 2008). При этом характер изменения активности ферментов зависит от природы металла, его концентрации и времени воздействия. Активность внеклеточных эстераз в присутствии Си существенно не изменяется, в то время как активность щелочной фосфатазы снижается – максимум на 70 % через 4 ч после начала воздействия (Предеина и др., 2006, 2008).

Кроме того, есть сведения о большей устойчивости к металлам внутриклеточных ферментов. Действительно, в результате продолжительного (30 сут.) действия Cd на мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* активность щеточнокаемной аминопептидазы снижается на 40 %, активность цитозольной глицилглициндипептидазы – лишь на 27 % (Gupta, Sastry, 1981), активность щеточнокаемной щелочной фосфатазы уменьшается на 60–80 %, лизосомальной кислой фосфатазы увеличивается на 30 % (Sastry, Subhadra, 1985). Это может быть связано с тем, что в присутствии металлов (Cd, Pb) наблюдаются деструктивные изменения щеточной каймы энтероцитов кишечника рыб (Sastry, Gupta, 1979; Crespo et al., 1986). В то же время увеличение активности лизосомальных гидролаз под влиянием токсических веществ обычно связано с клеточной дегенерацией и некрозом (Versteeg, Giesy, 1985). По всей вероятности, металлы, нарушая процессы окислительного фосфорилирования (Valee, Ulmer, 1972), стимулируют процессы гликолиза, в результате чего увеличивается содержание водородных ионов, высвобождающих лизосомальные гидролазы (Кузьмина, Голованова, 1997).

Также важно отметить, что значительная вариабельность эффекта одного и того же токсического агента обусловлена разной степени развития защитного барьера кишечника у рыб разных видов. Вследствие этого в хронических экспериментах реальные концентрации токсикантов в зоне щеточной каймы энтероцитов и особенно в цитозоле значительно отличаются от начальной концентрации токсиканта. Если это так, то особенности барьерной функции кишечника

(Кузьмина, 1995, 1999) у разных видов рыб должны рассматриваться наряду со структурно-функциональными особенностями тканевых барьеров других органов, в частности жабр (Тинсли, 1982; Матей, 1996).

*Влияние металлов на характеристики пищеварительных гидролаз.* Поскольку температура оказывает наибольшее влияние на активность и характеристики ферментов, в первую очередь будет рассмотрено влияние металлов на температурные характеристики пептидаз. Наиболее подробно этот вопрос исследован на примере каспийской тюльки *Clupeonella cultriventris* появившейся в районе Верхней Волги на рубеже XX–XXI вв. (Слынько и др., 2001). Показано, что в присутствии металлов форма кривой температурной зависимости существенно изменяется – снижается величина температурного оптимума и относительная активность, особенно в зоне постмаксимальных температур. Так, в контроле относительная активность гемоглоблинитических пептидаз желудка при температуре 0°C соответствует 45 %, в присутствии Zn и Cu – 43 и 29 %, при температуре 70°C – 60, 3.5 и 3 % от максимальной активности соответственно (Ушакова 2009).

При изучении активности пептидаз кишечника тюльки установлено, что форма кривой температурной зависимости казеинлитических пептидаз при pH 5.0 и гемоглоблинитических пептидаз при pH 3.0 в присутствии металлов изменяется слабо. Однако при pH 5.0 под влиянием Zn и Cu наблюдается смещение температурного оптимума гемоглоблинитических пептидаз влево. Форма кривой температурной зависимости пептидаз химуса в большей степени изменяется в случае активности гемоглоблинитических пептидаз и характеризуется более значительным снижением ферментативной активности во всем диапазоне исследованных температур. Если в контроле относительная активность казеин- и гемоглоблинитических пептидаз при 0°C соответствует 34 и 36 %, в присутствии Zn и Cu – 7 и 6, а также 27 и 28 %, то при 70°C – 48, 9 и 9 %, а также 87, 2 и 1 % соответственно (Ушакова, 2009).

Данные, касающиеся  $E_{\text{акт}}$  пептидаз, свидетельствуют о том, что в большинстве случаев в присутствии металлов изменяются не только величины  $E_{\text{акт}}$ , но и температура точки перегиба на графике Аррениуса.  $E_{\text{акт}}$  пептидаз желудка в присутствии Zn в зоне 0–10°C уменьшается в 1.2 раза, в присутствии Cu – увеличивается в 1.3 раза, в зоне более высоких температур – в 2.6 и 3.8, а также

в 8 и 12 раз соответственно.  $E_{\text{акт}}$  пептидаз кишечника в присутствии металлов во всех случаях увеличивается. Важно отметить, что в случае казеинлитических пептидаз точка перегиба на графике Аррениуса не изменяется, в случае гемоглобинлитических пептидаз смещается (от 10 до 20°C). При этом величины  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических пептидаз в присутствии металлов в зоне 0 – 10°C увеличиваются приблизительно в 2 раза, в зоне более высоких температур – в пределах 1.5 раз. Величины  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз также повышаются в пределе 1.5 раз. Особо следует подчеркнуть, что  $E_{\text{акт}}$  казеин- и гемоглобинлитических пептидаз химуса в присутствии металлов не изменяется в диапазоне 0–30°C. При этом  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз возрастает больше, чем казеинлитических. Так,  $E_{\text{акт}}$  гемоглобинлитических пептидаз увеличивается в присутствии Zn в 2.8, Cu – в 2.5 раза.  $E_{\text{акт}}$  казеинлитических пептидаз до точки перегиба снижается в 1.1, после точки перегиба возрастает в 1.8 раза (Ушакова, 2009).

При длительном воздействии Hg, поступающей с пищей в форме MeHg, на фоне значительного снижения активности гликозидаз в кишечнике у ряда видов рыб отмечено изменение их кинетических характеристик (Голованова и др., 2002, 2008; Голованова, Комов, 2005). При изучении влияния Hg на кинетические характеристики гликозидаз слизистой оболочки кишечника сеголетков плотвы *Rutilus rutilus*, получавшей с пищей в течение 4-х мес. металл в разных концентрациях, на фоне снижения амилолитической активности и активности сахаразы отмечено увеличение в 1.5–3 раза значений  $K_m$ , свидетельствующее о снижении фермент-субстратного сродства (Голованова и др., 2008).

При исследовании гидролиза углеводов в кишечнике окуня *Perca fluviatilis*, различающегося по содержанию в мышцах Hg, установлены значительные изменения кинетических характеристик гидролиза ди- и полисахаридов. При этом повышение содержания Hg сопровождается увеличением значений  $K_m$  в 2–3 раза. Однако значения  $V$  гидролиза крахмала и сахарозы в кишечнике окуня с увеличением содержания Hg повышаются не более, чем в 1.5 раза (Голованова, Комов, 2005). В то же время при исследовании хронического воздействия Hg на характеристики гликозидаз на фоне снижения амилолитической активности выявлены разнонаправленные измене-

ния  $K_m$  у окуня, обитающего в озёрах с разной кислотностью воды. У окуня, обитающего в нейтральном озере, наблюдается снижение фермент-субстратного сродства, у окуня, обитающего в кислотных озерах, – увеличение. По мнению Головановой и Комова (2005), последнее связано с большим содержанием Hg в тканях рыб из кислотных озёр.

Таким образом, температура в большей степени влияет на активность пептидаз, функционирующих в кишечнике, по сравнению с активностью пептидаз желудка рыб. Наличие металлов существенно влияет на температурную зависимость пептидаз пищеварительного тракта: резко снижается относительная активность всех исследованных ферментов в зоне низких и постмаксимальных температур, причем температурный оптимум пептидаз желудка смещается влево. Величины  $E_{акт}$  пептидаз пищеварительного тракта в диапазоне температур жизнедеятельности вида в присутствии металлов в большинстве случаев увеличиваются, негативно влияя на гидролиз белковых компонентов пищи. В результате длительного поступления Hg с пищей наблюдается снижение сродства к субстрату ди- и полисахаридов, замедляющее скорость гидролиза углеводных компонентов пищи (Голованова и др., 2008).

### **5.3. Влияние токсических веществ органической природы на активность и характеристики пищеварительных ферментов**

Загрязнение воды веществами органической природы, в частности фосфор- и хлорсодержащими пестицидами, фосфатными удобрениями и другими веществами, входящими в состав промышленных отходов и аварийных выбросов, рассматривается в числе наиболее опасных антропогенных факторов, пагубно влияющих на биоценозы (Лукьянренко, 1965, 1983; Тинсли, 1982; Moore, Ramamoorthy, 1984; Sastry, Subhadra, 1985; Crespo et al., 1986; Флеров, 1989). Благодаря устойчивости к действию физических и химических агентов эти вещества слабо подвергается естественному разложению, и продолжительное время негативно влияют на биоту. В многочисленных исследованиях установлена зависимость эффекта загрязнителей органической природы от их структуры, продолжительности воздействия и вида рыб (Филиппов и др., 2013).

*Влияния загрязнителей органической природы на активность и характеристики пептидаз пищеварительного тракта рыб.* В хроническом эксперименте (60 сут.) полиароматический углеводород (ПАУ) нафталин ( $C_{10}H_8$ ) в сублетальной концентрации 1.5 мг/л (1/15 24 ч ЛК<sub>50</sub>) фактически не влияет на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника тилапии *Oreochromis mossambicus*. В химусе активность пептидаз может увеличиваться по сравнению с контролем (Kuz'mina et al., 1999). Следовательно, нафталин не оказывает влияния на синтез и функционирование пептидаз, адсорбированных из полости кишечника, а также собственно кишечных ферментов тилапии. Увеличение активности пептидаз химуса под влиянием нафталина может быть обусловлено его взаимодействием с пищевыми субстратами и другими компонентами энтеральной среды.

При хроническом действии сырой нефти в концентрации 10 и 100 мг/л наблюдается снижение активности казеинлитических пептидаз у белого толстолобика *Hypophthalmichys molitrix*, белого амура *Stenopharyngodon idella*, карпа *Cyprinus carpio* и серебряного карася *Carassius auratus*. При этом на 7-е сут. эксперимента активность пептидаз снижалась при обеих концентрациях нефти. Через 14 сут. активность казеинлитических пептидаз восстанавливалась. Наибольшая устойчивость ферментов к нефтяной интоксикации отмечена у белого амура и белого толстолобика (Кравецкий и др., 2010).

Полихлорированные бифенилы (ПХБ), относящиеся к классу хлорорганических полициклических ароматических соединений, в хроническом эксперименте снижают активность пептидаз в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* как при их поступлении с пищей (50.8 нг/г сырой массы), так и при наличии в грунте (426 нг/г сухой массы). Активность пептидаз у рыб опытной группы снижается на 10–26 % на 40, 96 и 218-е сут. эксперимента. Активность ферментов в химусе у рыб изменяется разнонаправленно в зависимости от сроков эксперимента (Голованова и др., 2011).

Токсические свойства фосфорорганического пестицида хло-рофоса ( $C_4H_8Cl_3O_4$ ) в основном обусловлены более токсичным диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ), образующимся из него при  $pH > 5.5$ . При исследовании мозамбикской тилапии *Oreochromis mossambicus* показано, что в условиях 60-суточного эксперимента ДДВФ в сублетальной концентрации 0.46 мг/л (1/15 24 ч ЛК<sub>50</sub>)

не влияет на активность пептидаз (Kuz'mina et al., 1999). При изучении влияния ДДВФ (0.2 – 100 мг/л) в условиях *in vitro* на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у 11 видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище, достоверное снижение ферментативной активности (на 21 % от контроля) отмечено лишь у щуки *Esox lucius* при действии препарата в концентрации 0.2 мг/л (Golovanova et al., 1999).

Также есть сведения о влиянии на активность пептидаз двух представителей оловоорганических соединений – триэтилоловохлорида (ТАОХ) и триэтилоловохлорида (ТЭОХ). Действие ТАОХ и ТЭОХ на активность трипсина в кишечнике карпа *Cyprinus carpio* изучено в условиях хронических, 2-х месячных экспериментов. Показано, что ТАОХ в концентрациях 0.5 и 1 мг/л практически не влияет на активность пептидаз. ТЭОХ в этих же концентрациях уже на 1–2-е сут. опыта подавляет активность трипсина в 2–15 раз по сравнению с контролем, а в концентрациях 0.01 и 0.003 мг/л вызывает разнонаправленные изменения активности пептидаз на протяжении эксперимента (Бузинова, 1975, 1983).

В последней трети XX в. для борьбы с зарастанием водохранилищ, прудов и каналов (Williams et al., 2000; Borggaard, Gimsing, 2008; Duke, Powles, 2008; Rzymiski et al., 2013) стал использоваться глифосат. На основе изопропиламинной соли глифосата – N-(фосфонометил)-глицин,  $C_3H_8NO_5P$  был создан гербицид «Раундап», изначально считавшимся безвредным для животных, поскольку его мишенью является фермент растений, отсутствующий у животных (5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтаза, КФ 2.5.1.19). Важно отметить, что «Раундап» и другие производные глифосата, как правило, более токсичны. Большая токсичность «Раундапа» частично обусловлена содержащимся в нем поверхностно-активным веществом, которое в 20–70 раз токсичнее для рыб, чем глифосат (Сох, 2004). Поскольку этот гербицид широко используется в России, а сведения о его влиянии на рыб ограничены, ниже представлены данные, касающиеся влияния глифосата и «Раундапа» на гидробионтов.

Попадая в воду, а затем в организм гидробионтов, глифосат включается в метаболизм и вызывает нарушения процессов жизнедеятельности не только растений, но и у животных. Значения ПДК «Раундапа» для воды рыбохозяйственных водоемов соответствуют

0.001 мг/л, значения 96-ч ЛК<sub>50</sub> для разных видов гидробионтов варьируют от 2 до 620 мг/л (Folmar et al., 1979; Smith, Oehme, 1992; Аминов и др., 2013). Период полураспада глифосата в воде 7–14 сут. (Giesy et al., 2000). Препарат разрушается при участии микробиоты (Lushchak et al., 2009). Высокий уровень смертности гидробионтов (Rzymiski et al., 2013) может быть связан с влиянием глифосата на физиолого-биохимический и иммунологический статус рыб.

У рыб, подверженных действию препаратов на основе глифосата наблюдаются гистологические изменения, такие как некротические и пролиферативные поражения, аневризмы и лейкоцитарная инфильтрация в жабрах. В печени выявляются мультифокальные некротические процессы и жировая дистрофия, наблюдается набухание митохондрий и исчезновение внутренней мембраны митохондрий, а также и инфильтрация лейкоцитов (Neskovic et al. 1996; Szarek et al. 2000; Jiraungkoorskul et al. 2002, 2003; Ramirez Duarte et al. 2008; Hued et al. 2012; Deivasigamani, 2015). При исследовании гематологических показателей у *Catla catla* для экспериментального периода 24–96 ч при LC<sub>50</sub> глифосата, содержащегося в «Раундапе» (41 %) и равным 4.60x10<sup>-6</sup>/л, выявлено достоверное снижение количества эритроцитов, общих лейкоцитов, гемоглобина и гематокрита (Felix, Saradhamani, 2015). Важно отметить, что под влиянием «Раундапа» помимо названных выше изменений обнаружена гиперплазия слизистых клеток в желудке, а в головном мозге – дегенеративные очаги нейрональных тел, что может влиять на обоняние, индивидуальное и групповое поведение и репродуктивность рыб (Ramirez- Duarte et al. 2008).

В результате 96 ч воздействия встречающихся в природе концентраций глифосата (130 и 700 мкг/л) в составе препарата «Раундап» самцы гуппи *Poecilia vivipara*, показывают низкое качество спермы: снижение целостности плазматической мембраны, митохондриальной функциональности, целостности ДНК, подвижности и концентрации семенных клеток по сравнению с контролем (Harayashiki et al., 2013). При исследовании белого амура *Ctenopharyngodon idella*, белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* и карпа *Cyprinus carpio* установлено значительное снижение в печени под влиянием «Раундапа» концентрации липидов, активности липазы, а также малатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы у двух последних видов

рыб. При этом содержание глюкозы у всех исследованных видов рыб повышалось (Мехед, Жиденко, 2013). При исследовании гематологических показателей у *Catla catla* для экспериментального периода 24–96 ч при  $LC_{50}$  глифосата, содержащегося в «Раундапе» (41 %) и равным  $4.60 \times 10^{-6}$ /л, выявлено достоверное снижение количества эритроцитов, общих лейкоцитов, гемоглобина и гематокрита (Felix, Saradhamani, 2015). При изучении гематологических показателей у *Catla catla* в период 24–96 ч при  $LC_{50}$  глифосата, содержащегося в Раундапе (41 %) и равным  $4.60 \times 10^{-6}$ /л, выявлено достоверное снижение количества эритроцитов, общих лейкоцитов, гемоглобина и гематокрита (Felix, Saradhamani, 2015).

При исследовании транскриптома кумжы *Salmo trutta* выявлено 1020 дифференциально-регулируемых транскриптов, в том числе транскрипты, кодирующие компоненты антиоксидантной системы, ряд белков стресс-реакции и проапоптотических сигнальных молекул. Транскрипционные изменения свидетельствуют о формировании окислительного стресса и индукции компенсаторных путей ответа на стресс. Механизмы токсичности при воздействии глифосата и «Раундапа» в экологически значимых концентрациях сходны (Webster, Santos, 2015). Важно отметить, что существенные изменения в экспрессии транскриптов в этой работе были отмечены при самых низких концентрациях препаратов (0.01 мг/л). Кроме того, доказано повреждающее действие глифосата и «Раундапа» на ДНК эритроцитов и жаберных клеток рыб (Moreno et al., 2014), а также на процессы окислительного фосфорилирования (Peixoto, 2005). В присутствии 52.08 и 104.15 мг/л глифосата наблюдаются изменения в транскрипции иммуноглобулина IgM, комплемента C3 и лизоцима. При этом экспрессия мРНК иммуноглобулина IgM и комплемента C3 через 168 ч уменьшается при обеих концентрациях препарата. Экспрессия мРНК G- и C-типа лизоцима уменьшается в это же время. При этом отмечены гистопатологические поражения почек: вакуолизация паренхимы и утолщение почечных канальцев (Ma et al., 2015).

Влияние «Раундапа» на активность пептидаз подробно исследовано на примере густеры *Blicca bjoerkna*, плотвы *Rutilus rutilus*, карася *Carassius carassius*, окуня *Perca fluviatilis*, щуки *Esox lucius* и судака *Sander lucioperca*, обитающих в Рыбинском водохранилище. Показано, что величина и направленность его эффектов зависят

от концентрации препарата (0.1, 1, 10, 25, 50, 100 мкг/л в расчете на глифосат), вида рыб и локализации ферментов. В присутствии «Раундапа» в максимальной концентрации (100 мкг/л) наблюдается снижение активности казеинлитических пептидаз слизистой оболочки кишечника у бентофагов на 22–52 %, химуса – на 21–53 %, у ихтиофагов на 23–16 % и 37–50 % соответственно (Кузьмина и др., 2017). В то же время глифосат в концентрации 1.0 и 5.0 мг/л увеличивает активность трипсина и химотрипсина при обеих концентрациях препарата через 90 сут. воздействия на молодь лепомиса *Leporinus obtusidens* (Salbego et al., 2014).

Фенол и соединения фенольного ряда традиционно относят к группе нервно-паралитических ядов (Лукьяненко, 1983; Флеров, 1989). Вместе с тем известно, что у рыб фенол вызывает общую интоксикацию организма (Микряков и др., 2001). Важно отметить, что в естественных условиях фенол образуется в процессе метаболизма водных организмов, а также при биохимическом распаде и трансформации органических веществ, протекающих в воде и в донных отложениях (Dobbins et al., 1987; Michałowicz, Duda, 2007; Ali et al., 2011), и, как правило, не представляет опасности для экосистем. Бактерии, грибы, дрожжи и другие организмы часто используют фенол в качестве единственного источника углерода и энергии (Lewis et al., 1995). Однако при увеличении концентрации фенол и, особенно, его производные становятся опасными. Так, фенолы, образующиеся при разложении затопленной древесины, представляют собой одну из основных групп веществ, загрязняющих Енисей (Сурякова и др., 2011).

Особенно значительное количество фенолов поступает в водоемы и водотоки со сточными водами предприятий целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей, нефте- и сланцеперерабатывающей, коксо- и лесохимической, металлургической, а также анилиноокрасочной промышленности (Hori et al., 2006, 2008). Токсические эффекты фенола и его производных (генотоксический, иммунотоксический, гематологический, мутагенный, канцерогенный и другие) выявлены как у рыб, так и у других гидробионтов (Roche, Voge, 2000; Hori et al., 2006; Michałowicz, Duda, 2007; Mishra, Poddar, 2011). Токсичность фенолов зависит от присутствия в их молекуле атомов серы или различных групп (метильной, нитрогрупп, галоидов). Одними

из наиболее токсичных являются нитрофенольные (De Felice, Ferreira, 2006) и хлорфенольные соединения (Igbiosa et al., 2013).

При исследовании влияния фенолов на активность пищеварительных гидролаз у рыб показано, что степень их воздействия зависит от вида рыб, а также локализации фермента (слизистая оболочка или химус). В условиях *in vitro* фенол и его производные (4-хлорфенол, 4-нитрофенол и 2,4-динитрофенол) в концентрациях 0.06–0.5 ммоль/л, как правило, значительно снижают активность пептидаз кишечника у леща *Abramis brama*, густеры *Blicca bjoerkna*) и, особенно, щуки *Esox lucius*. В ряде случаев фенол и его производные в малых концентрациях вызывают незначительное увеличение уровня ферментативной активности. Активность пептидаз у судака *Sander lucioperca* и окуня *Perca fluviatilis* фактически не изменяется в присутствии этих токсических веществ. Эффекты фенола и его производных, по-видимому, зависят от структуры пептидаз: у представителей сем. окуневых Percidae ферменты относительно устойчивы к действию фенола и его производных, у представителей сем. карповых Cyprinidae и щучковых Esocidae пептидазы чувствительны к действию фенолов (Кузьмина и др., 2017).

При исследовании гликозидаз показано, что в тех же условиях фенол в концентрациях 0.03–0.5 ммоль/л значительно снижает амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника у судака, синца *Abramis ballerus* (L.) и леща, 4-нитрофенол – у судака *Sander lucioperca* и плотвы *Rutilus rutilus*. Гликозидазы густеры *Blicca bjoerkna*, окуня *Perca fluviatilis* и налима *Lota lota* устойчивы к действию этих веществ (Куливацкая и др., 2015). Предполагается, что в условиях *in vivo* фенол и его производные помимо прямого влияния могут оказывать опосредованное действие на активность гидролаз (Кузьмина и др., 2017). Действительно, в хронических экспериментах (28 сут.) на серебряном карасе *Carassius auratus* показано дозозависимое токсическое действие пентахлорфенола в дозах до 100 мкг/л на состав энтеральной микрофиты. Выявлено увеличение количества патогенных микроорганизмов, в частности бактерий из р. Bacteroides, сопровождающееся снижением массы тела, а также массы и активности ферментов печени рыб (Kan et al., 2015). В результате изменения состава энтеральной микрофиты может снижаться активность ферментов, участвующих в процессах симбионтного пищеварения.

*Влияния загрязнителей органической природы на активность и характеристики гликозидаз пищеварительного тракта рыб.* Нафталин в сублетальной концентрации (1.5 мг/л) в условиях *in vivo* на протяжении 60 сут. эксперимента практически не влияет на активность гликозидаз у тилапии *Oreochromis mossambicus*. В химусе активность пептидаз может увеличиваться по сравнению с контролем (Golovanova et al., 1994). В экспериментах *in vitro* подтверждено отсутствие значимых эффектов нафталина в концентрации 0.3 – 15 мг/л на уровень амилитической активности слизистой оболочки кишечника у 12 видов пресноводных костистых рыб (Golovanova et al., 1994). Следовательно, нафталин не оказывает влияния на структуру и функционирование мембранных и собственно кишечных гликозидаз тилапии.

В условиях хронического эксперимента сырая нефть в концентрации 10 и 100 мг/л снижает активность  $\alpha$ -амилазы и мальтазы у белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix*, белого амура *Ctenopharyngodon idella*, карпа *Cyprinus carpio* и серебряного карася *Carassius auratus*. На 7-е сут. эксперимента активность исследованных ферментов снижается при обеих концентрациях нефти. Через 14 сут. при меньшей концентрации нефти отмечена тенденция к восстановлению активности  $\alpha$ -амилазы, при концентрации 100 мг/л наблюдается дальнейшее угнетение активности обеих гликозидаз. Наибольшая устойчивость гликозидаз, как и пептидаз, к нефтяной интоксикации отмечена у белого амура и белого толстолобика (Кравецкий и др., 2010).

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) в условиях описанного выше хронического эксперимента снижают скорость начальных этапов ассимиляции углеводов в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus*. При этом активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника уменьшается на 11–33 % на 96-е сут., а значения  $K_m$  гидролиза крахмала увеличиваются на 23 % на 218-е сут. эксперимента. Активность гликозидаз в химусе у молоди плотвы при хроническом действии ПХБ изменяется разнонаправленно в зависимости от сроков эксперимента (Голованова и др., 2011). Повышенные концентрации ПХБ в корме и грунте в условиях *in vitro* увеличивают чувствительность гликозидаз слизистой оболочки кишечника у сеголетков плотвы к действию Cu и Zn в диапазоне концентраций 0.1 – 25 мг/л (Filipov, Golovanova, 2012).

Влияние дихлофоса (ДДВФ) на активность гликозидаз исследовано более подробно, чем пептидаз. Так, в хроническом эксперименте показано, что ДДВФ в сублетальной концентрации (0.46 мг/л) последовательно снижает уровень амилолитической активности у тилапии *Oreochromis mossambicus* с максимумом на 60 сут. (Golovanova et al., 1994). Однако в опытах *in vitro* ДДВФ в концентрациях 0.2 – 100 мг/л не влияет на активность гликозидаз слизистой оболочки у 11 видов рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище (Golovanova et al., 1999). Сопоставление эффектов ДДВФ в экспериментах *in vivo* и *in vitro* свидетельствует о том, что выявленные изменения ферментативной активности не являются специфическими, а негативный эффект при хроническом действии токсиканта обусловлен его действием на пищевое поведение рыб (Филиппов и др., 2013).

Вместе с тем при кратковременном действии хлорофоса на осемененную икру выявлены отдаленные эффекты, проявляющиеся в разнонаправленных изменениях активности и кинетических характеристик гликозидаз в кишечнике развивающейся молоди плотвы. При этом амилолитическая активность слизистой оболочки кишечника у 4-х месячных сеголетков снижалась по сравнению с особями контрольной группы. Максимальное снижение ферментативной активности (на 45–49 %) отмечено при концентрации хлорофоса  $1 \times 10^{-5}$  и  $1 \times 10^{-4}$  мг/л. Активность сахаразы, напротив, возрастает, причем наибольший стимулирующий эффект (на 90–103 %) выявлен в крайних точках диапазона концентраций. Разнонаправленные эффекты действия хлорофоса в период эмбриогенеза на амилолитическую активность и активность сахаразы у сеголетков плотвы авторы объясняют разным влиянием токсиканта на синтез панкреатических ( $\alpha$ -амилаза) и собственно кишечных (сахараза) ферментов. Значения  $K_m$  процесса гидролиза крахмала под влиянием хлорофоса снижается в 1.3–3.8 раза. Значения  $K_m$  сахаразы, напротив, возрастают в 2–4 раза. Следовательно, в первом случае фермент-субстратное сродство увеличивается, во втором – уменьшается (Голованова, Таликина, 2006).

Триамилловохлорид (ТАОХ) и триэтиловохлорид (ТЭОХ) оказывают различное влияние на активность гликозидаз в кишечнике карпа *Cyprinus carpio*. ТАОХ в концентрациях 0.5 и 1 мг/л в течение 1–3 нед. не влияет на активность  $\alpha$ -амилазы, в то время как ТЭОХ в этих же концентрациях уже на 1–2-е сут. эксперимента подавляет

активность  $\alpha$ -амилазы в 2–15 раз по сравнению с контролем. ТАОХ в концентрациях 0.01 и 0.001 мг/л через 30 сут. необратимо снижает амилалитическую активность в 2 раза. ТЭОХ в концентрациях 0.01 и 0.003 мг/л на протяжении эксперимента вызывает разнонаправленные изменения активности  $\alpha$ -амилазы (Бузинова, 1975, 1983).

В цикле исследований, выполненных под руководством И. Л. Головановой, установлено негативное действие N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (MNNG) – генотоксиканта с прямым влиянием на структуру ДНК, на активность гликозидаз. Показано, что кратковременное действие MNNG в концентрации 7.5 мг/л в период эмбриогенеза плотвы *Rutilus rutilus* изменяет скорость гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы и чувствительность пищеварительных гликозидаз к действию солей металлов (Котикова и др., 2005). Действие низких концентраций ( $3 \times 10^{-7}$ – $3 \times 10^{-2}$  мг/л) MNNG в период раннего эмбриогенеза снижает амилалитическую активность и активность сахаразы слизистой оболочки кишечника рыб (Голованова и др., 2008). В пределах испытанного диапазона концентраций MNNG амилалитическая активность снижается на 30–41 %, активность сахаразы – на 31–46 % по сравнению с контролем. Значения  $K_m$  гидролиза крахмала у сеголетков из опытной группы снижаются в 1.6–2.5 раза по сравнению с таковыми рыб контрольной группы. Изменение  $K_m$  сахаразы в зависимости от концентрации MNNG носит колебательный характер, наибольшее снижение показателя отмечено при концентрации токсиканта  $3 \times 10^{-5}$  и  $3 \times 10^{-1}$  мг/л (Голованова и др., 2008). В условиях *in vitro* сочетанное действие MNNG в широком диапазоне концентраций, а также Cu и Zn вызывает разнонаправленные изменения чувствительности пищеварительных гликозидаз у сеголетков плотвы (Filipov, Golovanova, 2012).

При исследовании «Раундапа» на амилалитическую активность и активность сахаразы, гидролизующих углеводы в кишечнике и в целом организме молоди рыб (тюлька *Clupeonella cultriventris*, щука, плотва *Rutilus rutilus*, карп и окунь), при действии *in vitro* гербицида в концентрации 0.1–50 мг/л (по глифосату) установлено, что гликозидазы слизистой оболочки кишечника более чувствительны к токсическому действию по сравнению с одноименными ферментами хмуса и целого организма (Голованова и др., 2011). «Раундап» оказывает большой токсический эффект на активность глико-

зидаз в тканях реальной жертвы (плотвы, извлеченной из желудка щуки) по сравнению с аналогичными ферментами потенциальной жертвы (Голованова, 2010).

При исследовании молодежи лепомиса *Leporinus obtusidens* выявлено увеличение активности амилазы через 90 сут. после начала воздействия глифосата в концентрациях 1.0 и 5.0 мг/л (Salbeo et al., 2014). При этом на эффекты глифосата и «Раундапа» может влиять температуры воды. Так, повышение температуры воды со скоростью 8° С/ч меняет эффект действия Раундапа на активность гликозидаз у разных видов рыб в зависимости от температуры предварительной акклимации. При этом ферменты, гидролизующие крахмал, более чувствительны к действию Раундапа во всех вариантах воздействия, чем мембранно-связанные ферменты, гидролизующие мальтозу (Голованова и др., 2015).

Сведений о влиянии загрязнителей на активность гидролаз объектов питания рыб крайне мало. Показано, что в условиях *in vivo* Hg вызывает разнонаправленные изменения активности гликозидаз и пептидаз в целом организме дафний *Daphnia magna* и личинок хирономид *Chironomus riparius*. При их раздельном содержании в течение 1 мес. в аквариумах с добавлением корма, содержащего 0.3 мг Hg/кг сырой массы в метилированной форме, уровень амилолитической активности в целом организме дафний снижается на 60 % от контроля, хирономид – фактически не изменяется. Активность пептидаз, напротив, у дафний не изменяется, у хирономид снижается на 60 % от контроля. При их совместном содержании в одном аквариуме амилолитическая и протеолитическая активность у дафний не изменяется, у хирономид – снижается на 30 и 69 % соответственно. Активность сахаразы в организме дафний в присутствии Hg повышается на 45, хирономид – на 53 % по сравнению с контролем (Голованова и др., 2002).

Также известно о влиянии в условиях *in vitro* «Раундапа» в концентрациях 0.1–10.0 мг/л (по глифосату) на активность гликозидаз в пробах рачкового зоопланктона, включающего представителей отр. Cladocera, Copepoda и Ostracoda, и лабораторной монокультуры дафнии *Daphnia magna*, статистически значимые эффекты в большинстве случаев не выявлены. Однако в концентрации 0.1 мг/л «Раундап» повышает амилолитическую активность в про-

бах рачкового зоопланктона на 13 %. У дафний уровень амилолитической активности повышается на 24 и 30 %, при сублетальных концентрациях «Раундапа» 25.0 и 50.0 мг/л, активность сахаразы – на 28 и 85 % от контроля соответственно (Голованова, Папченкова, 2009). В хронических экспериментах (15 сут.) «Раундап» в концентрации 25 и 50 мг/л снижают амилолитическую активность, но повышает активность пептидаз в целом организме дафний в ряду четырех поколений (Папченкова и др., 2009). При этом хроническое действие токсических веществ на пищеварительные ферменты рыб и их объектов питания характеризуется чередованием периодов стимуляции и угнетения. Аналогичный фазовый характер прослеживается и при анализе зависимости эффекта при действии различных концентраций токсикантов (Филиппов, 2013).

#### **5.4. Влияние магнитных полей и геомагнитных бурь на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки рыб**

Геомагнитное поле (ГМП) – важный экологический фактор, влияющий на биологические системы (Otsuka et al., 2001; Mendoza, de la Pena, 2010). Эволюция биоты происходит на фоне ГМП, параметры которого изменялись в разные периоды существования Земли (Сое, Prevot, 1989; Vogue, Glen, 2010). На естественное ГМП накладываются антропогенные магнитные поля (МП), параметры которых широко варьируют (Leitgeb et al., 2008), причем ГМП может подвергаться антропогенной модификации (Гульельми, Зотов, 1986). При этом ослабление и изменение направления вектора ГМП могут приводить к различным биологическим эффектам (Krylov et al., 2013).

Слабые переменные МП искусственного происхождения также могут вызывать различные реакции у биологических объектов (Lagroye et al., 2011). Поскольку на планете постоянно присутствует ГМП, биологические эффекты искусственных МП принято считать результатом воздействия комбинированного магнитного поля (КМП), представляющего собой суперпозицию постоянного ГМП и переменного МП. При определенном соотношении таких параметров КМП, как величина индукции постоянного МП ( $B_{dc}$ ), индукция переменного МП ( $B_{ac}$ ) и частота переменного МП ( $F_{ac}$ ) возникают

резонансоподобные ответы в биологических системах (Lednev, 1991; Леднев, 1996; Белова, Панчелюга, 2010).

Биофизическая модель, описывающая появление этих эффектов в ответ на действие КМП, предполагает воздействие низкочастотного МП на ионы, лигандированные специфичными центрами ион связывающих белков. При этом связанный ион рассматривается как изотропный заряженный осциллятор. В постоянном МП, в роли которого чаще всего выступает ГМП, возникает прецессия оси вибраций ионного осциллятора. При определенных значениях параметров переменного низкочастотного МП (резонансные условия) изменяется характер прецессии. Последнее приводит к тому, что воздействие низкочастотного МП с параметрами резонанса для определенного иона приводит к уменьшению константы связывания иона молекулой белка (Леднев, 1996). В ряде экспериментальных работ показано, что наиболее заметные эффекты вызывают именно КМП с параметрами резонанса для биологически значимых ионов (Шувалова и др., 1991; Леднев, 1996; Белова и др., 2010; Канцерова и др., 2013).

Ниже приведены результаты изучения влияния КМП с параметрами резонанса для ионов кальция и калия, а также гипомагнитных условий и инверсии вертикальной компоненты ГМП на активность протеиназ и гликозидаз, обеспечивающих деполимеризацию белковых и углеводных компонентов пищи в кишечнике рыб.

*Влияние геомагнитных полей на активность пептидаз и гликозидаз в кишечнике рыб.* Проведено несколько серий экспериментов. В первой серии опытов объектом исследования были сеголетки карася *Carassius carassius*. В экспериментах использовались четыре разных МП: КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; КМП с резонансными параметрами для ионов  $\text{K}^{+}$ ; инвертированное ГМП; гипомагнитные условия. В качестве контроля во всех экспериментах использовалось естественное геомагнитное поле.

Исследование влияния КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на активность пептидаз позволило выявить достоверное снижение значения этого показателя через 1 ч после начала эксперимента (на 29.4 %), через 2 ч – увеличение на 19.6 % (рис. 5.3 а). При действии КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{K}^{+}$  в течение 1 ч также отмечено снижение активности пептидаз на 33.3 % по сравнению с контролем. Исследование влияния КМП с параметрами резонанса

для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника карася также выявило достоверное снижение показателя (на 62.5 %) через 1 ч после начала эксперимента (рис. 5.3 б). Через 2 ч амилолитическую активность увеличивает на 25.8 %. При действии КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{K}^+$  в течение 1 ч отмечено снижение на 34.3 % по сравнению с контролем.

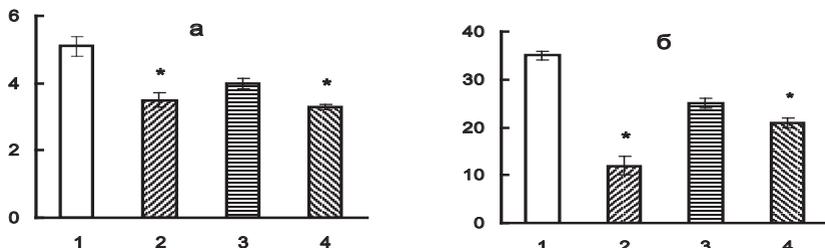


Рис. 5.3. Влияние КМП с параметрами резонанса для ионов кальция и калия на протеолитическую (а) и амилолитическую (б) активности ферментов кишечника карася (по: Кузьмина и др., 2015 в)

Обозначения: 1 – контроль; 2 и 3 – действия КМП с параметрами резонанса для ионов кальция в течение 1 и 2 ч соответственно; 4 – действие КМП с параметрами резонанса для ионов калия в течение 1 ч. –  $p \leq 0.01$ , для рис. 2.

В гипомагнитных условиях наблюдается снижение (на 43.1 %) активности пептидаз (рис. 5.4 а). В тех же условиях АА снижается лишь на 32.8 % (рис. 5.4 б). При исследовании влияния инверсии МП на активность пептидаз слизистой оболочки кишечника карася обнаружено более существенное и достоверное снижение показателя (на 76.5 %). При изучении амилолитической активности, напротив, выявлено ее увеличение на 48.4 %.

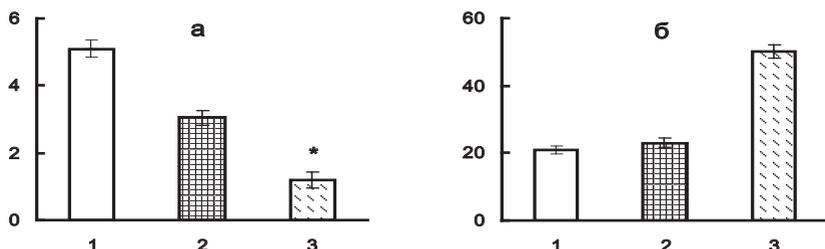


Рис. 5.4. Влияние гипомагнитных условий и инверсии ГМП на протеолитическую (а) и амилолитическую (б) активности ферментов кишечника карася (по: Кузьмина и др., 2015 в).

У сеголеток плотвы *Rutilus rutilus*, развивавшихся в течение эмбрионального периода в гипوماгнитных условиях, наиболее выраженные изменения размеров тела рыб отмечались после воздействия флуктуаций магнитного поля за период 48–72 ч после оплодотворения. Важно отметить, что при этом значения  $K_m$  гидролиза крахмала, сахарозы и мальтозы были на 22, 37 и 82 % ниже, чем в контроле, соответственно (Голованова и др., 2015).

Интересны результаты исследования отдаленных последствий действия индуцированного МП (500 Гц, 150 мкТ) на икру плотвы *Rutilus rutilus* в течение 60 ч после оплодотворения на амилолитическую активность у сеголетков (Голованова и др., 2006). Результатом этого воздействия было снижение амилолитической активности и увеличение активности сахаразы у сеголеток. Однако в более поздней работе, выполненной в близких методических условиях, но с использованием МП с другими параметрами (72.5 Гц, 150 мкТ) были получены противоположные результаты. В этих условиях у сеголеток плотвы наблюдалось увеличение амилолитической активности и снижение активности сахаразы (Голованова и др., 2013). Вопрос о влиянии искусственных магнитных полей на активность панкреатических и собственно кишечных ферментов, обеспечивающих конечные этапы гидролиза полисахаридов, требует дальнейшей экспериментальной проверки. В настоящее время не ясно, чем обусловлены выявленные И. Л. Головановой и соавторами (2006, 2013) различия в характере ответа исследованных ферментов – различиями параметров МП и конформационных изменений белковых глобул фермента, нарушениями липидного матрикса мембран под влиянием МП или различиями кормовой базы в прудах с контрольными и опытными рыбами.

Кроме того, в условиях *in vitro* изучены отдаленные эффекты раздельного и комбинированного воздействия Cu (0.001 мг/л и 0.01 мг/л), а также низкочастотного МП в условиях *in vivo* в период раннего эмбриогенеза плотвы *Rutilus rutilus*. Показано, что экспозиция в низкочастотном МП приводит к изменениям линейных и весовых параметров, активности гликозидаз и кинетических характеристик гидролиза углеводов в кишечнике рыб. При этом значения амилолитической активности возрастают, а активности сахаразы, напротив, уменьшаются. При этом Cu модифицирует влияние МП. Отдаленные последствия комбинированного воздействия меди при низких кон-

центрациях (особенно 0.01 мг/л) и МП снижают амилолитическую активность и активность сахаразы в кишечнике рыб опытной группы. МП не влияет на значение  $K_m$  гидролиза крахмала, но снижает значение  $K_m$  гидролиза сахарозы. Важно, что значения  $K_m$  для гидролиза полисахарида в присутствии обеих концентраций  $Cu$  уменьшаются,  $K_m$  сахарозы уменьшается только в присутствии  $Cu$  в более низкой концентрации. Снижение значения константы Михаэлиса гидролиза углеводов приводит к увеличению сродства к ферменту и субстрату. По мнению авторов, это явление можно объяснить адаптивными реакциями в ответ на отрицательные эффекты  $Cu$  и МП в период раннего онтогенеза плотвы (Голованова и др., 2013).

Описанные выше данные подтверждают справедливость модели действия КМП на биологические объекты, известной как «параметрический резонанс в биосистемах» или «ионный резонанс» в ранних публикациях (Шувалова и др., 1991; Lednev, 1991; Blanchard, Blackman, 1994; Белова, Панчелюга, 2010; Белова и др., 2010; Канцерова и др., 2013). Поскольку в основе этой гипотезы лежит представление о том, что мишенью воздействия КМП являются ионы, взаимодействующие с ион связывающим центром ферментативно активного белка, важно отметить, что  $\alpha$ -амилаза, находящаяся в начале цепи гликозидаз, – кальций-зависимый фермент. Ион  $Ca^{2+}$  в трехмерной структуре этого фермента располагается около активного центра и выполняет стабилизирующую функцию (Уголев, Кузьмина, 1993).

КМП с параметрами резонанса для ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  приводит к уменьшению активности изучаемых ферментов. Однако ранее было показано, что инкубация различных объектов в КМП с параметрами резонанса для ионов  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  может приводить к возникновению эффектов разного знака (McLeod et al., 1987; Леднев, 1996; Белова, Леднев, 2001; Белова и др., 2010). КМП с параметрами резонанса для ионов  $K^+$  в условиях *in vivo* при воздействии в течение 1 ч приводит к увеличению активности кальпаинов мышц и мозга карася *Carassius carassius* более чем на 40 %. Однако в условиях *in vitro* влияние КМП с параметрами резонанса для ионов  $K^+$  на исследуемые показатели у разных видов рыб разнонаправленно. Так, активность кальпаинов в мышцах плотвы *Rutilus rutilus* увеличивается на 250.2 %, в мышцах карпа *Cyprinus carpio* уменьшается на 27.9 % (Канцерова и др., 2013).

При изучении влияния низкочастотных МП в условиях *in vivo* на активность кальцийзависимых внутриклеточных пептидаз мышц и мозга карася *Carassius carassius* показано, что КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  снижает активность кальпаинов мышц карася на 44.6 % при воздействии в течение 1 ч и на 74.8 % при двухчасовом воздействии. Активность кальпаинов мозга значительно снижается после часовой экспозиции в КМП (на 81.2 %). Однако через 2 ч воздействия снижение уровня активности ферментов не превышает 30 %. Ингибирующее действие КМП с параметрами резонанса для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на кальпаины в опытах *in vitro* было еще более существенным. В этих условиях активность кальпаинов, выделенных из мышц и мозга плотвы, снижается на 79.0 и 89.9 % соответственно, из мышц карпа – на 85.1 % (Канцерова и др., 2013).

Также показано, что МП с частотой 37 ГГц (используемая интенсивность МП в работе не указана) способно модифицировать активность пепсина крыс. При этом вращение вектора МП вправо приводит к увеличению, влево – к снижению ферментативной активности. В первом случае наблюдается гипертрофия главных клеток в антральном отделе, во втором появление некротических участков в слизистой оболочке желудка (Субботина и др., 2004). Кроме того есть сведения о том, что МП может влиять на свойства воды (Яблокова и др., 2007). Это, в свою очередь, может приводить к конформационным изменениям и молекул фермента, и молекул субстратов. На снижение активность пептидаз кишечника рыб, выявленное при воздействии КМП, могут влиять как отмеченные факторы, так и ингибирование металлопротеиназ энтеральной микробиоты.

Важно отметить различие реакций ферментов разных цепей: гипомагнитные условия и инверсия ГМП уменьшают активность пептидаз, в то время как гипомагнитные условия снижают, а инверсия ГМП увеличивает амилолитическую активность. Механизмы этих различий не вполне ясны. Одной из причин может быть различная доступность субстратов. Последнее позволяет предположить, что решающим фактором, влияющим на скорость ферментативной реакции, может быть изменение свойств воды, необходимой для процессов гидролиза (Яблокова и др., 2007). При этом большое значение придается влиянию МП на свойства водных

растворов ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , присутствующих в инкубационной среде (Аугаретян et al., 1994; Ruzic, Jerman, 1998).

Кроме того, важную роль могут играть различия в локализации пептидаз и гликозидаз. Если ферменты, обеспечивающие начальные этапы гидролиза белков и полисахаридов, локализованы на структурах гликокаликса, то ферменты, реализующие заключительные этапы, имеют различную локализацию. Ферменты группы мальтаз и  $\gamma$ -амилаза, обеспечивающие заключительные этапы гидролиза полисахаридов, будучи трансмембранными ферментами, более прочно связаны с апикальной мембраной энтероцитов, чем реализующие конечные этапы гидролиза белков латерально расположенные пептидазы (Egorova, Ugolev, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993). Латеральная локализация пептидаз может способствовать их солиubilизации, которая в свою очередь, может вызывать изменение конформации ферментов, в результате которой может изменяться структура активного центра ферментов. Ранее возможность конформационных изменений ферментов была продемонстрирована при изучении влияния МП на конформацию S-аденозилгомоцистеин гидролазы (Porcellia et al., 1997).

*Влияние геомагнитной бури на активность пептидаз и гликозидаз в кишечнике рыб.* Геомагнитной или магнитной бурей (МБ) называют связанное с солнечной активностью возмущение геомагнитного поля (ГМП) длительностью от нескольких часов до нескольких суток, которое сопровождается повышением индексов геомагнитной активности. Типичные МБ состоят из ряда сменяющих друг друга характерных интервалов: начальная фаза (незначительное усиление напряженности и флуктуаций ГМП), главная фаза (относительно резкое падение напряженности ГМП) и фаза восстановления (медленное колебательное восстановление значений ГМП) (Akasofu, Chapman, 1972).

Биологическая значимость МБ была установлена Чижевским (1936). Позднее в большинстве работ выявлялись связь между реально случившимися МБ и различными физиологическими показателями (Knox et al., 1979, Cornelissen et al., 2002; Stoilova, Dimitrova, 2008). При этом из-за неточности в регистрации геомагнитной активности при определении физиологических показателей трудно выделить фазы МБ, обладающие наибольшей биологической эф-

фективностью (Ораевский и др., 1998). Кроме того, влияет несовпадение во времени биологических макроэффектов и эффективной фазы МБ за счет того, что передача сигнала от первичной мишени воздействия до регистрируемого эффекта может занимать определенное время.

Воспроизведение МБ в лабораторных условиях требует сложного технического сопровождения, что затрудняет экспериментальное изучение этого экологического фактора. В некоторых экспериментах предпринимались попытки имитировать геомагнитные возмущения, однако используемые сигналы были далеки от естественных (Dupont et al., 2004; Persinger et al., 2005). Эксперименты, проведенные на растениях (лен *Linum bienne*) и беспозвоночных (дафния *Daphnia magna*), указывают на то, что наибольшей биологической эффективностью могут обладать максимальные флуктуации ГМП во время МБ, т. е. главная фаза и фаза восстановления МБ (Крылов, 2012). При исследовании рыб (каarp *Cyprinus carpio*, карась *Carassius carassius*) МБ воспроизводили в оригинальной экспериментальной установке, позволяющей компенсировать в рабочем объеме флуктуации ГМП и создавать сложные магнитные поля (Крылов и др., 2011). В опытах воспроизводилась МБ на основе широкополосного сигнала реальной бури (октябрь 2003 г.), записанной на широте проведения экспериментов.

*Влияние магнитной бури на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника карпа.* В первом цикле экспериментов, проведенных весной, после воздействия МБ в течение 20 ч уровень активности пептидаз слизистой оболочки кишечника у голодных особей карпа достоверно снижается, у сытых рыб – не изменяется (рис. 5.5 а). Зимой активность пептидаз слизистой оболочки кишечника у рыб оказалась ниже, чем весной (рис. 5.5 б). Однако после воздействия МБ активность пептидаз достоверно не изменилась ни у голодных, ни у сытых рыб. Амилолитическая активность слизистой оболочки кишечника в этот период у голодных рыб после воздействия МБ достоверно снижается, у сытых рыб практически не изменяется (рис. 5.5 в). Зимой после воздействия МБ уровень амилолитической активности достоверно снижается (в 2.1 и 2.2 раза) и у голодных, и у сытых рыб (рис. 5.5 г).

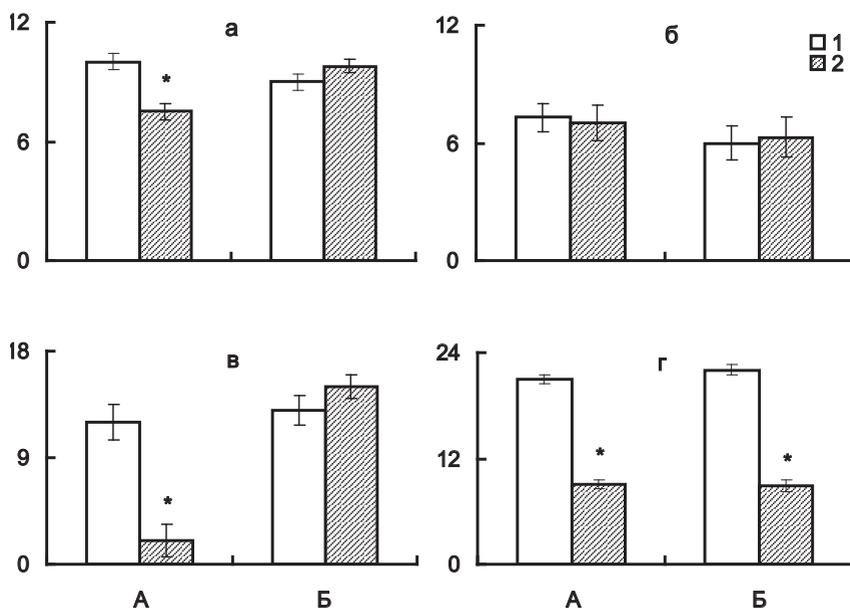


Рис. 5.5. Влияние МБ на активность пептидаз ( $\mu\text{моль}/(\text{г}\cdot\text{мин})$ ) слизистой оболочки кишечника карпов весной (а, б) и гликозидаз (в, г) весной (а, в) и зимой (б, г) у голодных (А) и сытых рыб (Б) (по: Кузьмина и др. 2014 в) Обозначения: 1 – контроль, 2 – опыт. \* – изменения активности достоверны при  $p \leq 0.05$ .

*Влияние различных фаз магнитной бури на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника карася.* В третьем цикле, проведенном в феврале, исследовали влияние главной фазы и фазы восстановления МБ на активность пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника карася. Эти два интервала МБ отчетливо различаются амплитудой флуктуаций. Воздействие изучаемой фазы МБ проводилось непосредственно во время инкубации гомогената слизистой оболочки кишечника и соответствующего субстрата в течение 30 мин. При воздействии МБ выявлено снижение активности пептидаз, наиболее значительное во время главной фазы бури. Фаза восстановления МБ существенно не влияет на активность пептидаз (рис. 5.6).

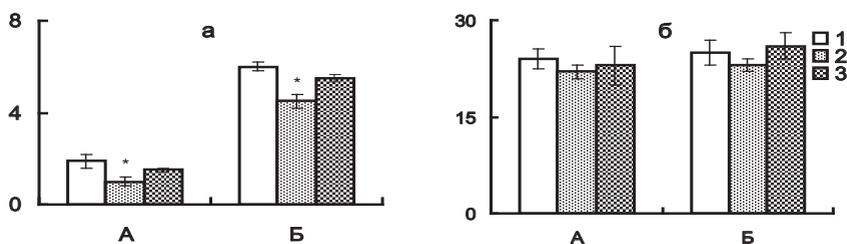


Рис. 5.6. Влияние различных фаз МБ на активность пептидаз (а) и гликозидаз (б) слизистой оболочки кишечника карася, мкмоль/(г·мин) (по: Кузьмина и др. 2014 в) Обозначения: А – голодные, Б – сытые рыбы. 1 – контроль, 2 – главная фаза, 3 – фаза восстановления. \* – изменения активности достоверны, при  $p \leq 0.05$ .

Как показывает рис 5.6, при воздействии МБ наблюдается снижение активности пептидаз и у голодных, и у сытых рыб, наиболее значительное во время главной фазы бури. В фазе восстановления активность пептидаз ниже контроля, но выше по сравнению с главной фазой. Амилолитическая активность во время главной фазы МБ у голодных и сытых рыб недостоверно уменьшилась. В фазу восстановления наблюдались некоторые различия в изменении ферментативной активности: у голодных рыб практически не изменяется, а сытых – наблюдается незначительное увеличение показателя.

Также следует отметить различное влияние МБ на активность гликозидаз в опытах *in vivo* и *in vitro*. В опытах *in vivo* МБ, как правило, вызывает достоверное снижение амилолитической активности, в опытах *in vitro* уменьшение значений этого показателя наблюдается только в главной фазе. Если бы эти опыты были проведены на одном виде рыб, то полученные результаты свидетельствовали бы о непосредственном влиянии МБ на ферменты, липопротеиновый матрикс мембран, субстрат и вещества, входящие в состав энтеральной среды. Однако, несмотря на то, что карась и карп, будучи представителями сем. карповых, Cyprinidae, достаточно близки в систематическом отношении, нельзя исключать и наличие видовых различий в характере влияния МБ на амилолитическую активность.

В опытах *in vitro* также наблюдалось достоверное снижение активности пептидаз. Разнонаправленность эффектов МБ на ферменты разных цепей может быть обусловлена рядом причин. Во-первых, субстраты для определения амилолитической и протеолитической

активностей – полисахарид крахмал и белок казеин. Столь различные структуры субстратов позволяют предположить, что решающий фактор, влияющий на скорость ферментативной реакции, – изменение структуры воды, необходимой для гидролиза субстрата. Действительно, было высказано предположение, что свойства воды и водных растворов могут изменяться под действием МП (Зенин, 1999). При этом большое значение придается участию ионов, например  $\text{Ca}^{2+}$ , присутствующих в инкубационной среде, в изменении структуры водных растворов (Augaretyan et al., 1994; Ruzic, Jerman, 1998).

Кроме того, ферменты группы мальтаз и  $\gamma$ -амилаза, обеспечивающие заключительные этапы гидролиза полисахаридов, будучи трансмембранными ферментами, более прочно связаны с апикальной мембраной энтероцитов, чем реализующие конечные этапы гидролиза белков латерально расположенные пептидазы (Egogova, Ugolev, 1989). Латеральная локализация пептидаз может способствовать их солюбилизации. В свою очередь солюбилизация может влиять на конформации ферментов. Возможность конформационных изменений ферментов продемонстрирована при изучении влияния магнитных полей на конформацию S-аденозилгомоцистеин гидролазы (Porcellia et al., 1997).

Особо следует отметить, что наибольшие отклонения показателей в опыте по сравнению с контролем наблюдались в главной фазе МБ. Этот факт хорошо согласуется с данными, полученными при оценке гравитропической реакции у льна *Linum bienne*. Как указывалось выше, наибольшая биологическая эффективность характерна для тех отрезков МБ, во время которых происходит большее изменение напряженности ГМП, т. е. в главной фазе и на начальных этапах фазы восстановления (Крылов, 2012). Размах амплитуды исследованных сигналов в главной фазе МБ и фазе восстановления составил около 300 и 30 нТл соответственно. Предполагается, что более сильное градиентное изменение внешнего постоянного поля во время МБ приводит к большим изменениям колебательных процессов спинов ядер атомов и ионов в молекулах белка (Lednev, 1991; Белова, Панчелюга, 2010). Последнее может приводить к различным эффектам на более высоких уровнях организации.

Наконец, важно подчеркнуть зависимость эффектов МБ от функционального состояния рыб. Как показали опыты, проведен-

ные на карпе *Cyprinus carpio* в условиях *in vivo*, летом у голодных рыб активность гликозидаз под влиянием МБ снижается в 5.5 раза, пептидаз – в 1.4 раза, у сытых – достоверно не изменяется. Зимой под влиянием МБ активность пептидаз не изменяется, но активность гликозидаз достоверно уменьшается в 2.1 и 2.2 раза независимо от трофического статуса рыб. В опытах, проведенных на карасе *Carassius carassius* в условиях *in vitro*, активность пептидаз под влиянием МБ у голодных и сытых рыб снижается в 1.9 и 1.4 раза соответственно. Следовательно, у голодных рыб обоих видов уровень ферментативной активности, как правило, снижается в большей степени, чем у сытых. По всей вероятности, одна из причин большей устойчивости ферментов у сытых рыб – большая насыщенность инкубационной среды органическими и неорганическими молекулами, часть из которых может, присоединяясь к регуляторным сайтам, стабилизировать их глобулы. Вместе с тем, отсутствие зависимости эффектов МБ от степени накормленности рыб зимой, свидетельствует о возможном влиянии неконтролируемых факторов.

В цикле исследований, проведенных под руководством И. Л. Головановой, получены сведения, касающиеся отдаленных последствий действия флуктуаций магнитного поля, имитирующих главную фазу и начальный период фазы восстановления МБ в диапазоне 0–0.001 Гц. В этих опытах эмбрионы плотвы *Rutilus rutilus* подвергались воздействию МБ с интенсивностью 100, 300 и 500 нТл в периоды до (1–6 ч после оплодотворения) и после (33–39 ч после оплодотворения) гастрюляции. Контрольная группа находилась в условиях естественного магнитного поля. Максимальное влияние на изученные показатели выявлено при действии МБ (100 нТл) на эмбрионы после гастрюляции. Длина и масса сеголетков, подвергшихся действию МБ после гастрюляции, были ниже, а амилолитическая активность и значения  $K_m$  гидролиза крахмала в кишечнике рыб опытных групп были выше, чем у рыб контрольной группы. У первых относительная активность ферментов в зоне температур жизнедеятельности была выше, а зона температурного оптимума (40°C) гидролиза крахмала шире, чем у вторых – 50°C (Голованова и др., 2016; Golovanova et al., 2017). Кроме того, выявлены адаптивные изменения характеристик мальтазы, в том числе увеличение сродства к субстрату и уменьшение величин  $E_{акт}$  в диапазоне температур окружающей среды. Значе-

ния  $K_m$  мальтазы молоди плоты были значительно ниже в группах, подвергшихся действию 100 нТ МБ до гастрюляции, 300 нТ МБ и 500 нТ МБ после гастрюляции соответственно на 49, 22 и 57 % по сравнению с контролем (Голованова и др., 2016).

При изучении отдаленных последствий воздействия МБ на ранние стадии эмбриогенеза плотвы *Rutilus rutilus* (0–24 ч, 24–48 ч, 48–72 ч и 72–96 ч после оплодотворения) показано, что флуктуации магнитного поля приводит к уменьшению длины и веса рыб. Максимальное снижение длины (на 19 %) и массы тела (на 49 %) у рыб в возрасте 4 мес. по сравнению с контролем отмечены после воздействия на рыб МБ в течение 48–72 ч после оплодотворения. Кроме того, выявлены изменения амилолитической активности, активности мальтазы и сахаразы, а также кинетических характеристик гидролиза углеводов.

В варианте с воздействием рыбы на моделируемую МБ в течение первых 24 ч после оплодотворения амилолитическая активность и активность сахаразы снижается на 15 и 26 % по сравнению с контролем. Значения других параметров повышаются:  $K_m$  гидролиза крахмала – на 36 %, активность мальтазы и  $V$  гидролиза мальтозы – на 15, 28, и на 36 % соответственно. В варианте опыта с воздействием МБ в течение 48 ч после оплодотворения уровень амилолитической активности был на 26 %, мальтазы – на 32% выше, чем в контроле. При этом значения  $K_m$  гидролиза крахмала, сахарозы и мальтозы были ниже, чем в контроле на 41, 32 и 36 % соответственно. Воздействие МБ на более поздних стадиях эмбриогенеза активность гликозидаз и кинетические параметры гидролиза не столь значительно (Голованова и др., 2015). Несколько иные результаты получены при изучении последствий воздействия на эмбрионы плотвы *Rutilus rutilus* типичной МБ (длительность 24 ч в частотном диапазоне 0–5 Гц) через 72 ч после оплодотворения. Авторами установлено снижение амилолитической активности и активности мальтазы в кишечнике 4-месячных особей плотвы. При этом МБ также не влияла на температурные и кинетические характеристики ферментов (Filipov et al., 2014).

Кроме того, есть сведения о влиянии МБ (диапазон частот 0–5 Гц) на активность и чувствительность амилолитической активности и мальтазы к ионам  $x$  металлов (Cu и Zn, концентрации 0.1 – 25 мг/л)

и гербициду «Раундап» (0.1 – 50 мкг/л). Показано, что в результате воздействия МБ на эмбрионы плотвы *Rutilus rutilus* (48–72 ч после оплодотворения) у 4-х месячных сеголетков в большинстве случаев чувствительность гликозидаз повышается. Так, при действии МБ амиллитическая активность в присутствии в Си снижается на 14–94 %, Zn – на 21–46 % по сравнению с контролем во всем диапазоне исследованных концентраций. Эффект «Раундап» сильнее выражен при низких концентрациях гербицида (0.1–1.0 мкг/л). При этом чувствительность ферментов, гидролизующих крахмал, увеличивается в большей степени по сравнению с таковой мальтазы (Голованова и др., 2016).

В заключение следует отметить, что различные эффекты МБ на ферменты, принадлежащие к разным цепям, могут быть вызваны несколькими факторами. Как подчеркивалось выше, одним из решающих факторов может быть различная структура полисахарида крахмала и белка казеина. При этом на скорость ферментативных реакций может влиять изменение свойств воды и водных растворов (Зенин, 1999). Большое значение придается участию ионов, например  $Ca^{2+}$ , присутствующим в инкубационной среде, в изменении структуры водных растворов (Augaretyan et al., 1994; Ruzic, Jerman, 1998).

Кроме того, важную роль могут играть различия в локализации пептидаз и гликозидаз. Ферменты, обеспечивающие начальные этапы гидролиза белков и полисахаридов, локализованы на структурах гликокаликса. Ферменты, реализующие заключительные этапы, имеют различную локализацию. Ферменты группы мальтаз и  $\gamma$ -амилаза, обеспечивающие заключительные этапы гидролиза полисахаридов более прочно связаны с апикальной мембраной энтероцитов, чем реализующие конечные этапы гидролиза белков латерально расположенные пептидазы (Ugolev, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993). Латеральная локализация пептидаз может способствовать их солубилизации, которая в свою очередь, может вызывать изменение конформации ферментов, в результате которой может изменяться структура активного центра ферментов.

Также важно отметить, что наибольшие отклонения показателей в опыте по сравнению с контролем наблюдались в главной фазе МБ, что хорошо согласуется с данными, полученными на других объектах. Так, при оценке гравитропической реакции у льна наибольшая биологическая эффективность была характерна для тех

отрезков МБ, во время которых происходит большее изменение напряженности ГМП, т. е. в главной фазе и на начальных этапах фазы восстановления (Крылов, 2012). Размах амплитуды исследованных сигналов в главной фазе МБ и фазе восстановления соответствовал приблизительно 300 и 30 нТл соответственно. Более сильное градиентное изменение внешнего постоянного поля во время МБ может приводить к большим изменениям колебательных процессов спинов ядер атомов и ионов в молекулах белка (Lednev, 1991; Белова, Панчелюга, 2010). Последнее может лежать в основе различных эффектов на более высоких уровнях организации организмов.

Наконец, важно обсудить зависимость эффектов МБ от функционального состояния рыб. Как показали опыты, проведенные на карпе *Cyprinus carpio* в условиях *in vivo*, а также на карасе *Carassius carassius* в условиях *in vitro*, активность пептидаз под влиянием МБ у голодных рыб, как правило, снижается в большей степени, чем у сытых. Было высказано предположение, что одной из причин большей устойчивости пептидаз у сытых рыб является большая насыщенность инкубационной среды органическими и неорганическими молекулами, часть из которых может, присоединяясь к регуляторным сайтам, стабилизировать глобулы ферментов (Кузьмина и др., 2014 в).

## 5.5. Заключительные замечания

Как показано в этой главе, различные антропогенные факторы, как правило, значительно снижают активность пищеварительных гидролаз. При исследовании влияния загрязнителей различной природы на активность и характеристики ферментов установлено, что токсический эффект зависит от структуры, концентрации токсического вещества и продолжительности экспозиции, а также от структуры пищевого субстрата, вида и функционального состояния рыб, условий эксперимента, влияния ряда абиотических факторов среды и локализации исследуемых ферментов. При этом ксенобиотики могут ингибировать активный центр ферментов. В случае хронического действия различных веществ может доминировать опосредованное влияние разных систем организма на синтез и функционирование ферментов (Alabaster, Lloyd, 1980, Лукьяненко, 1983; Мур, Рамамурти, 1987; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005; Кузьми-

на, 2005, 2008). В результате токсичными становятся значительно меньшие концентрации одних и тех же веществ.

Наибольшее внимание уделялось изучению влияния на пищеварительные гидролазы рыб соединений металлов. Интерес к их изучению, возникший во второй половине XX в., не ослабевает, поскольку до сих пор не устранены источники загрязнения ими водной среды. Первоначально при изучении влияния металлов на различные аспекты жизнедеятельности рыб основное внимание уделялось эффектам неэссенциальных металлов, таких как Pb, Cd и Hg. Однако вскоре стало ясно, что увеличение в гидроэкосистемах концентрации эссенциальных металлов, в частности Zn и Cu, также пагубно воздействует на гидробионтов. Важно отметить, что в присутствии металлов не только значительно снижается активность ферментов, но существенно изменяются их характеристики. В частности, снижается величина температурного оптимума и относительная активность пептидаз в зоне постмаксимальных температур. При этом величины  $E_{\text{акт}}$  пептидаз в присутствии металлов увеличиваются, а их эффективность снижается, приблизительно в 1.5–2 раза (Ушакова, 2009).

Важно отметить, что значительное накопление металлов в организме рыб и других водных животных наблюдается не только в местах их сбросов, но и на участках водоемов и водотоков, находящихся на большом расстоянии от предприятий, загрязняющих гидросферу, что обусловлено возможностью их аэротехногенного переноса. Несмотря на значительную вариабельность данных, касающихся накопления металлов в различных органах рыб разных видов, не вызывает сомнения, что в наибольшей степени они аккумулируются в тканях, отличающихся повышенным метаболизмом. Особая роль при этом принадлежит печени. При этом не все количество металлов, поступающих в пищеварительный тракт, взаимодействует с пищеварительными ферментами, поскольку большинство из них находятся в форме, связанной с белками, аминокислотами и другими органическими соединениями. Особая роль в детоксикации и выведения металлов из организма рыб принадлежит металлотионеинам – белкам с молекулярной массой от <3 до 70 кДа и глутатиону (Бауман, 1977; Коновалов, 2001; Поева и др., 1999; Dang et al., 1999; Muto et al., 1999; Pourang et al., 2004; Doering et al., 2015).

Высокое содержание металлотионеинов в цитозоле энтероцитов (Brown et al., 1990) позволило предположить большую защищенность внутриклеточных ферментов по сравнению с мембранными ферментами (Кузьмина, 2008). Это предположение подтверждается упоминавшимися ранее данными о том, что при хроническом действии Cd на мешкожаберного сома *Heteropneustes fossilis* активность щеточнокаемной аминопептидазы снижается на 40 %, активность цитозольной глицилглициндипептидазы – лишь на 27 % (Gupta, Sastry, 1981), активность щеточнокаемной щелочной фосфатазы уменьшается на 60–80%, лизосомальной кислой фосфатазы увеличивается на 30 % (Sastry, Subhadra, 1985).

Большое значение, вероятно, имеет аминокислотный состав белков тканей жертвы. В частности, гистидин, цистеин и таурин способствуют увеличению накопления Zn в виде хелатирующего комплекса в зоне щеточной каймы энтероцитов. Однако только цистеин способствует поглощению металла (Glover, Hogstrand, 2002). При этом на примере Zn показано, что металл, поступающий с пищей или водой, связывается преимущественно с низкомолекулярной фракцией. Не меньшего внимания заслуживает тот факт, что в случае, когда количество металлов превышает связывающую способность белков, они могут аккумулироваться небелковыми соединениями (Коновалов, 2001; Столяр, 2003).

Вместе с тем значительное количество биогенных металлов, поступающих в кишечник в составе панкреатического сока и желчи, увеличивает их пул. При этом Zn и Cu, поступающие в пищеварительный тракт в форме неорганических соединений, могут значительно подавлять активность пищеварительных гидролаз лишь в том случае, когда возможности организма образовывать хелатные комплексы с белковыми компонентами химуса, недостаточны для их связывания. Последнее косвенно подтверждается данными, свидетельствующими о плохом усвоении рыбами Zn и Cu, поступающими с пищей в форме неорганических соединений (Остроумова, 2001), а также о значительных преимуществах использования хелата Zn по сравнению с сульфатом в аквакультуре (Lovell, 1996).

Представленные выше данные отражают снижение активности пептидаз под влиянием металлов, поступающих в пищеварительный тракт в форме неорганических и органических соединений.

При этом в условиях строго белковой диеты, всасывание Zn в кишечнике снижается (Бауман, 1977), в результате чего его концентрация в химусе может увеличиваться, а активность пептидаз, обеспечивающих полостной и мембранный гидролиз белковых компонентов пищи – снижаться. Вследствие этого планкто- и бентофаги, а также факультативные ихтиофаги благодаря разнообразию состава пищи, даже при наличии в тканях объектов их питания металлов имеют определенные преимущества по сравнению с типичными ихтиофагами.

Поскольку в большинстве работ исследуется слизистая оболочка пищеварительного тракта, ясно, что при изучении влияния токсикантов на пищеварительные гидролазы оценивается активность ферментов, локализованных либо в зоне щеточной каймы энтероцитов, в цитозоле или лизосомах, либо в строме слизистой. При этом ферменты указанных групп не только функционируют в разных условиях, но и в разной мере защищены от взаимодействия с токсическими веществами благодаря сложной многоуровневой структуре защитного барьера пищеварительного тракта (Кузьмина, 1995, 1999 б). Надежность структурного барьера может увеличиваться под влиянием ксенобиотиков, вызывающих увеличение продукции слизи бокаловидными клетками (Sastry, Gupta, 1979; Crespo et al., 1986). Также не исключено, что из-за разной степени развития защитного барьера кишечника у рыб разных видов в хронических экспериментах реальные концентрации токсикантов в зоне щеточной каймы энтероцитов и особенно в цитозоле значительно отличаются от их начальной концентрации. Вследствие этого, результаты экспериментов, выполненных в условиях *in vitro* не отражают величину реального эффекта и, как правило, оказываются завышенными.

При исследовании приоритетных загрязнителей органической природы также установлена зависимость эффекта от структуры токсиканта, продолжительности его воздействия и вида рыб. Так, полиароматический углеводород нафталин ( $C_{10}H_8$ ) в сублетальной концентрации (1.5 мг/л) в условиях хронического эксперимента (60 сут.) практически не влияет на активность гликозидаз у тиляпии *Oreochromis mossambicus*, фосфорорганический инсектицид дихлофос ( $C_4H_7O_4Cl_2P$ ) в сублетальной концентрации (0.46 мг/л) последовательно снижает уровень общей амилолитической активности с максимумом на 60 сут. (Golovanova et al., 1994). Гербицид

«Раундап» в условиях *in vitro*, как правило, оказывает ингибирующий эффект на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника и химуса у рыб разных видов (Голованова и др., 2011; Аминов, 2018). Устойчивость пептидаз к препарату видоспецифична. «Раундап» в низких концентрациях негативно влияет на активность пищеварительных пептидаз у большинства, в более высоких (50–100 мкг/л) – у всех исследованных видов рыб (Кузьмина и др., 2017 б). При этом стрессирование химическими агентами различной природы в период раннего онтогенеза рыб оказывает значительное воздействие на активность и характеристики пищеварительных гидролаз сеголетков (Голованова и др., 2006, 2013; Golovanova et al., 2015, 2016, 2017).

Особого внимания заслуживает влияние естественного и измененного ГМП на активность пищеварительных ферментов рыб. Важно отметить отрицательное влияние искусственного ГМП и МБ на активность пептидаз и амилолитическую активность слизистой оболочки у рыб разных видов. Сходство между влиянием ГМП и МБ на активность амилаз у животных и растений подтверждает древнее происхождение гидролаз (Уголев, 1985, 1989). Значительный интерес представляют данные, свидетельствующие о том, что действие естественных и искусственных ГМП на эмбрионы рыб может вызывать изменение активности и характеристик пищеварительных гликозидаз у сеголетков. При этом величина и направленность наблюдаемых эффектов зависят от интенсивности искусственных ГМП и стадий эмбриогенеза рыб (Голованова и др., 2016).

Также важно отметить, что в условиях *in vivo* МБ, как правило, вызывает значительное снижение активности гликозидаз, но слабо влияет на активность пептидаз (достоверное уменьшение ферментативной активности отмечено только у голодных рыб). При исследовании влияния отдельных фаз МБ на активность тех же ферментов в условиях *in vitro* выявлена противоположная тенденция. Независимо от условий эксперимента МБ в большей степени негативно влияет на ферментные системы голодных рыб. При исследовании отдаленных последствий МБ на активность гликозидаз выявлена значительная зависимость эффекта отдельных ферментов от характеристик МБ, а также времени ее воздействия на эмбрионы рыб (Кузьмина и др., 2014 в, 2015 в; Голованова и др., 2016).

Вместе с тем влияние отставленных эффектов искусственных ГМП и МБ на активность ферментов, участвующих в начальных и заключительных стадиях гидролиза пищевых субстратов, требует дополнительных экспериментальных исследований. В настоящее время не ясно, вызвана ли модификация активности ферментов конформационными изменениями в их белковой глобуле, нарушениями в липидном матриксе мембран под влиянием ГМП или разным состоянием кормовой базы у контрольных и опытных рыб, содержащихся в разных прудах. Также необходимо отметить различное влияние МБ на активность ферментов в условиях *in vivo* и *in vitro*. Как правило, МБ в условиях *in vivo* вызывает статистически значимое снижение активности гликозидаз, в то время как в экспериментах *in vitro* их активность снижается только во время основной фазы МБ. Кроме того, необходимы дополнительные исследования влияния физиологического статуса рыб на эффекты МП и МБ.

Таким образом, сведения о влиянии загрязняющих веществ на активность пищеварительных ферментов рыб в значительной мере фрагментарны. Имеющиеся данные свидетельствуют о зависимости токсического эффекта от физической и химической природы, дозы, времени воздействия токсического агента, условий эксперимента, локализации исследуемых ферментов и, по-видимому, ряда абиотических и биотических факторов среды, а также, по всей вероятности, от и степени развития защитного барьера пищеварительного тракта рыб. Изменение характеристик ГМП, а также наличие загрязняющих веществ в воде в концентрациях, встречающихся в природе, могут снижать активность пищеварительных гидролаз слизистой оболочки желудка и кишечника и, как следствие, эффективность начальных этапов ассимиляции пищи, особенно у ихтиофагов. Последнее не может не отражаться на численности и биомассе популяций рыб, а также на рыбопродуктивности водоемов. При этом степень влияния на активность пищеварительных гидролаз зависит от характера воздействия, концентрации токсических веществ, вида рыб, а также структуры фермента и субстрата.

## **Глава 6. Роль мультифункциональности пищеварительного тракта, полипотентности ферментов рыб и их адаптаций в функционировании водных экосистем**

Постулируя принципы «современного функционализма», А. М. Уголев (1985), помимо принципов эффективности, универсальности, гомеостаза и циклизации, рассматривал принципы компромисса, множественности и полиэссенциальности. А. М. Уголев выделял два типа множественности: полифункциональность (мультифункциональность) и полипотентность. Первый принцип реализуется главным образом на уровне органа, второй – на молекулярном уровне. Мультифункциональность подразумевает наличие полезных, побочных и, возможно, отрицательных эффектов, которые составляют основу для дифференциации и специализации органов, расширения или сокращения их функций и т. д. В случае полипотентности некоторые функциональные блоки («молекулярные машины») могут участвовать в выполнении различных функций.

Мультифункциональность и полипотентность в сочетании с иерархической структурой биологических систем обеспечивают множественность связей между различными системами, которые формируют организацию более высокого порядка, в то время как различные эффекты тех же структурно-функциональных единиц могут контролироваться различными факторами эволюции, включая естественный отбор. Суть принципа компромисса заключается в том, что функционирование отдельных подсистем в сложных биологических системах происходит на уровнях, которые не являются ни оптимальными, ни абсолютно невыгодными, а на уровне оптимального компромисса. Принцип оптимального компромисса полезен для анализа функциональной эволюции отдельных систем организма, целых организмов, а также популяций и экосистем (Уголев, 1985, с. 459, 460). Последнее особенно важно, поскольку он касается популяций, в которых происходит обмен генетической информацией. При этом структура и особенности функционирования экосистем активно влияют на элиминацию

неэффективных и сохранение большинства экономически выгодных изменений в процессах, происходящих на разных уровнях организации организмов.

### **6.1. Роль полифункциональности пищеварительного тракта рыб**

Ранее было показано, что пищеварительный тракт позвоночных выполняет помимо трофической функции также защитные (неспецифические и иммунные), регуляторные и метаболические функции (Уголев, 1978; Уголев и др., 1992). Вскоре эти функции пищеварительного тракта были описаны у рыб (Кузьмина, 1995, 1999; Buddington, et al., 1997). В монографии «The multifunctional gut of fish» (Grosell et al., 2011) опубликован ряд фундаментальных обзоров, которые касались не только морфологического разнообразия желудочно-кишечного тракта у рыб (Wilson, Castro, 2011), но и многообразия характера их питания, а также особенностей пищеварения и поглощения питательных веществ (Bakke et al., 2011). Кроме того, была описана роль желудочно-кишечного тракта в поддержании иммунитета (Cain, Swan, 2011), солевого и водного баланса (Grossel, 2011), газообмена, кислотно-щелочного равновесия и метаболизма азота (Taylor et al., 2011), а также в дыхании (Nelson et al., 2011). Также в этой монографии значительное внимание уделялось эндокринной/нейроэндокринной/паракринной (Takei, Loretz, 2011) и нервной системе желудочно-кишечного тракта (Olsson, 2011).

У рыб пищеварительная система, помимо вышеуказанных функций, также выполняет механическую, энзиматическую и специфическую защитную функцию (Кузьмина, 1995; 1999), в том числе систему детоксикации, включающую металлотеонеины, цитохром P450 и антиоксидантную защиту (Gorbi et al., 2005; Vergani et al., 2009; Huang et al., 2014). Кроме того, была описана трансформационная (Кузьмина, 1999) и метаболическая функция, которая впервые рассматривалась, как конечная стадия процессов эндотрофии у рыб (Кузьмина, 1999; Kuz'mina, 2017). Действительно, в многочисленных работах было выявлено дифференцированное поступление в желудочно-кишечный тракт значительного количества различных компонентов внутренней среды, способных компенсировать

их отсутствие в рационе рыб (Щербина, 1980), а также осуществлять перераспределение запасов в периоды длительного сезонного голодания, нерестовых миграций и т. д. (Love, 1970; Шульман, 1972; Шатуновский, 1980; Shulman, Love, 1999).

Важно отметить, что первые данные о выделении в пищеварительный тракт позвоночных наиболее важных компонентов внутренней среды, таких как белки, жиры, углеводы, минеральные вещества и другие, появились к началу 1940-х годов (Разенков, 1948). Позднее была описана метаболическая функция пищеварительного тракта (Шлыгин, 1974; Seth et al., 2011), рециклинг различных веществ (Уголев, 1985; Seth et al., 2011; Grosell, 2011), а также высказано предположение о важной роли этого феномена в поддержании гомеостаза энтеральной среды (Гальперин, Лазарев, 1986).

Нами была предложена иная интерпретация феномена выделения в кишечную полость различных эндогенных веществ – белков, аминокислот, белкового азота, углеводов, липидов и минеральных веществ. Поскольку вещества, выделяющиеся в пищеварительный тракт, могут быть вовлечены в процессы пищеварения и транспорта, было предложено рассмотреть этот аспект деятельности пищеварительного тракта как конечное звено процессов эндотрофии (Кузьмина, 1999 б). Процесс эндотрофии, тесно связанный с метаболической функцией пищеварительной системы, наиболее важен для анадромных рыб в период нерестовых миграций (Shulman, Love, 1999).

В настоящее время не вызывает сомнения важная роль лизосомальных гидролаз, кальпанов и других ферментов, функционирующих в различных тканях рыб, в осуществлении процессов эндотрофии (Кузьмина, 1999 б). Действительно, имеющиеся данные свидетельствуют о возрастающей роли гидролитического аппарата лизосом и других систем, участвующих в процессах распада при неблагоприятных для экзогенного питания рыб условиях (Сорвачев, 1982; Немова, 1996; Высоцкая, Немова, 2008). Пути и интенсивность процессов катаболизма и рециркуляции различных соединений, во многом зависят от конкретных экологических условий (Kuz'mina, 2017). Температура, содержание кислорода и соленость воды влияют на активность лизосомальных гидролаз в разных органах и тканях рыб (Высоцкая, Немова, 2008), а также на пути расщепления гликогена. Так, у рыб, приспособленных к обитанию

при более высокой температуре, гликоген в основном разрушается в процессе гликолиза, у рыб, приспособившихся к низким температурам – при участии пентозного шунта (Плисецкая, 1975).

Изучение мультифункциональности пищеварительного тракта у рыб, отличающихся исключительным видовым разнообразием, а также разнообразием спектра питания, расширило представления об изменчивости наиболее важных характеристик пищеварительной системы, связанных как с реализацией трофической функции, так и с реализацией других жизненно важных функций.

## **6.2. Роль полипотентности пищеварительных ферментов рыб**

*Трофическая функция.* Традиционно физиология пищеварения рассматривает трофическую функцию только в плане процессов экзотрофии (Кузьмина, 1995, 1999). Однако, как отмечалось выше, различные животные, в том числе многие виды рыб, в течение длительного времени выключают процессы экзогенного питания, поддерживая энергетические и пластические потребности организма только за счет процессов эндотрофии (Сорвачев, 1982). В первой главе приведена шестизвенная схема, включающая пять взаимосвязанных типов пищеварения, которые обеспечивают деполимеризацию пищевых объектов и перенос питательных веществ на транспортные системы. При этом три типа переваривания (полости, мембраны и внутриклеточные) реализуются ферментными системами организма-ассимилятора, два другие (симбионтное пищеварение и индуцированный аутолиз) – ферментами микрофлоры и объектов питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005, 2015; Kuz'mina, 2017).

Важно отметить, что участие одних и тех же ферментов в реализации различных механизмов пищеварения имеет фундаментальное значение. Ниже описаны приведенные ранее аргументы (Kuz'mina, 2017):

1) ферменты, участвующие в гидролизе одного и того же субстрата, но имеющие различную локализацию и функционирующие в разных условиях, могут влиять на эффективность одних механизмов, но не влиять на эффективность других (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993);

2) участие ферментов микрофлоры и объектов питания рыб в процессах пищеварения уменьшает энергетические и пластические затраты организма на синтез собственных пищеварительных гидролаз (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993);

3) микрофлора является поставщиком веществ, которые не могут усваиваться из-за отсутствия у рыб соответствующих гидролаз (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Clements, 1997; Ganguly, Prosad, 2012; Ray et al., 2012);

4) до настоящего времени полостное пищеварение считалось детально изученным. Однако результаты последних лет показали несостоятельность этих представлений, поскольку традиционные методы не позволяют корректно дифференцировать вклад ферментов консументов, жертв и симбионтов;

5) для эффективной реализации трофической функции важно соответствие биохимического состава объектов питания и активности пищеварительных гидролаз консумента, а также наличие микробного сообщества. Последнее связано с тем, что микроорганизмы способны значительно трансформировать поток питательных веществ, создавая вторичный поток нутриентов (Уголев, 1985; Лубянскене и др., 1989);

6) вклад экзогенных ферментов в процессы пищеварения рыб предложено рассматривать в качестве экологической компоненты, поскольку спектр и интенсивность питания рыб, а также состав микрофлоры различаются даже у рыб одного вида в зависимости от экологических особенностей водоема (Кузьмина, 1991; Kuz'mina, 2017).

Изменения характеристик ферментов, реализующих процессы экзо- и эндотрофии у рыб, в значительной мере адаптивны. При этом адаптации ферментов к условиям функционирования часто наблюдаются на более высоких уровнях, чем организменный, т.е. на уровне популяций и биоценозов. Как было показано выше, исследование в идентичных методических условиях активности пищеварительных гидролаз у рыб показало, что объекты питания могут вносить существенный вклад в пул гидролаз, разрушающих высокомолекулярные компоненты тканей жертвы. Так, максимальная активность пептидаз и минимальная активность гликозидаз характерны для объектов питания ихтиофагов. В то же время максимальная активность гликозидаз и минимальная активность

пептидаз наблюдается у донных организмов, особенно у моллюсков (Кузьмина, 1981; Уголев, Кузьмина, 1993). Близкая закономерность зафиксирована при изучении микрофлоры кишечника у рыб разных видов (Лубянскене и др., 1989). Адаптивные перестройки, происходящие на всех уровнях организации пищеварительной функции рыб, иерархически включают все типы и механизмы известных в настоящее время адаптаций (Кузьмина, 1996, 2001). Важную роль при этом играет комплекс регуляторных механизмов, включающий нервную и гормональную регуляцию (Шпарковский, 1986; Fange, Grove, 1979; Baddington, Krogdahl, 2004; Holmgren, Olsson, 2009; Takei, Loretz, 2011; Olsson, 2011 Rønnestad et al., 2013), и процессы саморегуляции (Уголев, 1972).

*Защитная функция.* Известно, что содержимое пищеварительного тракта животных является частью внешней среды по отношению к внутренней среде организма (Thomas, 1964). С водой и пищей рыб из естественных популяций в их желудочно-кишечный тракт попадают различные компоненты внешней среды. Поступление в пищеварительный тракт некоторых компонентов пищи, в частности белков, рассматривается как аллергическая и токсическая агрессия (Уголев, 1991; Уголев и др., 1992). Видовая специфичность чужеродных белков исчезает в результате их ферментативной деградации. При этом пищеварительные гидролазы, особенно пептидазы, разрушающие белки, наряду со структурами желудочно-кишечного тракта выступают в роли неспецифического защитного барьера (Уголев и др., 1992).

Защитная функция пищеварительной системы у рыб изучена слабо, что в значительной степени связано с отсутствием у костистых рыб лимфатических узлов, в том числе Пейеровых или лимфоидных бляшек, реализующих специфическую иммунную защиту у высших позвоночных (Лукьяненко, 1971; Микряков, 1991; Кузьмина, 1999 б, Cain, Swan, 2011). После появления публикаций, свидетельствующих о важной роли неспецифического защитного барьера тонкого кишечника у млекопитающих (Уголев и др., 1992), были проанализированы различные механизмы защитной функции рыб (Кузьмина, 1995). В этой работе было показано, что у рыб также существует эффективная система защиты от токсической и аллергической агрессии, механизмы которой несколь-

ко отличаются от механизмов, описанных для млекопитающих. В частности, было показано, что у рыб разных видов структурные и ферментативные барьеры охватывают весь желудочно-кишечный тракт, в том числе дистальные отделы кишечника. То, что стенка пищеварительного тракта, является барьером между гастро-энтеральной и внутренней средой организма, никогда не вызывал сомнений. Однако только работы последних десятилетий позволили понять уникальную роль апикальной мембраны эпителиоцитов, в частности энтероцитов, которые функционируют как молекулярное сито. Как указывалось в первой главе, расстояние между микроворсинками апикальной мембраны энтероцитов обычно составляет 1–2 мкм; размер ячеек гликокаликса, как минимум, на два порядка ниже. Эффективный радиус пор апикальной мембраны значительно меньше расстояния между нитями гликокаликса и составляет 0.4–0.6 нм (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 1995). Этот цифровой ряд показывает, что апикальная мембрана энтероцитов не может быть преодолена ни бактериями, ни крупными молекулами, входящими в состав тканей объектов питания рыб (Кузьмина, 1995, 1999 б).

В последнее время большое внимание уделяется барьерной функции слизи, в состав которой входят высокомолекулярные протеиды, отличающиеся высоким содержанием углеводов и низким содержанием белков и липидов. Количественный и качественный состав углеводов зависит от вида животных (Гальперин, Лазарев, 1986; Морозов и др., 1988; Уголев и др., 1992). Исследование ультраструктуры слизи показало, что секретируемая бокаловидными клетками слизь первоначально имеет высокую плотность. Распределяясь в пристеночном слое, слизь формирует нитевидные и сетчатые структуры, причем значительная часть молекул гликопротеида не включается в полимерную сеть, а находится в растворимой фракции, что увеличивает ее вязкость (Морозов и др., 1988). Это придает слизи механические защитные свойства, а присутствие гликопротеинов и мукополисахаридов обуславливает ионообменные свойства слизи (Гальперин, Лазарев, 1986; Морозов и др. 1988; Уголев и др., 1992). В эпителии слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб также широко представлены клетки, продуцирующие слизь. Эпителий слизистой оболочки желудка выделяет секрет, дающий

положительную ШИК-реакцию, но не окрашивающийся на кислые мукополисахариды. Секрет бокаловидных клеток кишечника дает положительную реакцию на кислые и нейтральные мукополисахариды (Кароог et al., 1975; Веригина, Жолдасова, 1982), что позволяет предположить значительное сходство его свойств и функций с таковыми у млекопитающих (Кузьмина, 2005).

При анализе энзиматического барьера пищеварительного тракта рыб было выделено девять основных и один дополнительный уровень, а также семь основных и два дополнительных источника ферментов, в значительной мере основанных на радиальной компарментализации их желудочно-кишечного тракта (рис. 6.1).

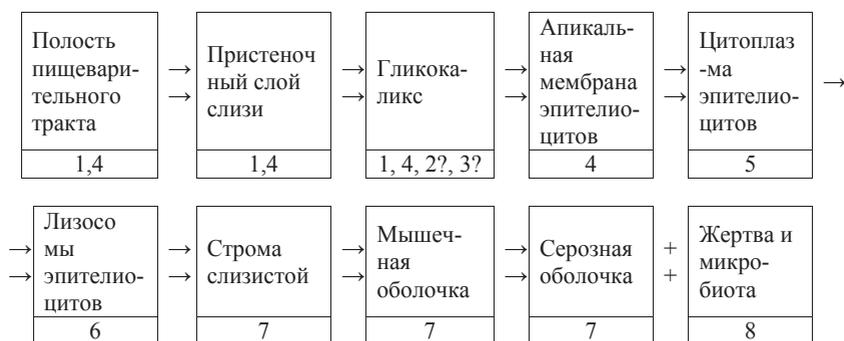


Рис. 6.1. Схема уровней энзиматического барьера пищеварительного тракта рыб (по: Кузьмина, 1995, с дополнениями)

Обозначения: 1 – ферменты пищеварительных желез, 2 – ферменты симбионтов, 3 – ферменты жертвы, 4 – ферменты мембран эпителиоцитов, 5 – ферменты цитозоля эпителиоцитов, 6 – ферменты лизосом эпителиоцитов, 7 – «не пищеварительные» ферменты постэпителиальных слоев, 8 – ферменты жертвы, обеспечивающие аутодеградацию.

Как показывает этот рисунок, в полости и слое слизи доминируют ферменты, которые секретируются желудочными железами и гепатопанкреасом, а также ферменты жертвы и микрофлоры. На структурах гликокаликса могут присутствовать те же ферменты. Начиная с апикальной мембраны энтероцитов, гидролиз реализуется собственно кишечными ферментами, которые заполняют мембрану и полностью реализуют два варианта внутриклеточного (цитозольного и лизосомального) пищеварения. Если белки сохраняют

свою структуру при прохождении через эпителий, могут активироваться ферменты стромы слизистой оболочки и подслизистых слоев и, если необходимо, ферменты других постэпителиальных слоев, активность которых в некоторых случаях (дипептидазы) превышает активность энтероцитов (Уголев, Кузьмина, 1992). Если добыча полностью проглочена, ее ферментные системы служат дополнительным энзиматическим барьером (Кузьмина, 1995).

Важно отметить уменьшение гетерогенности источников ферментов по мере приближения к апикальной мембране эпителиальных клеток, а также постепенную стабилизацию условий функционирования ферментов. Начиная с апикальной мембраны энтероцитов, ферментативный пул однороден по происхождению. Степень гетерогенности и соотношение ферментов различных цепей (гидролизующих в пределах цепи один и тот же тип субстрата) в значительной мере зависит от характера питания и анатомии пищеварительного тракта рыб. Так, у рыб, перетирающих глоточными зубами пищу, в желудок или кишечник попадают объекты питания с частично разрушенными тканями, в которые довольно легко могут проникать пищеварительные ферменты организма-ассимилятора. У ихтиофагов, поглощающих жертву целиком, ферменты желудочного сока (реже панкреатического) из-за большой молекулярной массы не могут быстро проникать внутрь жертвы, минуя ее покровы. В этом случае особенно велика роль механизма индуцированного аутолиза, реализуемого лизосомальными ферментами тканей жертвы (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, Цветкова, 2001).

Активации лизосомальных гидролаз способствует усиление процессов гликолиза и подкисление цитоплазмы в условиях отсутствия аэробного дыхания (Уголев, 1985). Выше были перечислены ферменты, способные разрушать химические связи в разных субстратах. Особую роль в деградации структур жертвы, вероятно, играют катепсины В, D, H и L, выполняющие у живых организмов регуляторные функции (Высоцкая, Немова, 2008; Лысенко и др., 2011). Катепсин L участвует в иммунных реакциях (Zhu et al., 2008; Ma et al., 2010; Liang et al., 2012; Zhao et al., 2013). Однако после смерти жертвы эти ферменты могут вовлекаться в процессы индуцированного аутолиза.

Степень развития защитных ферментативных механизмов у рыб различных видов различна и в значительной степени зависит от характера их питания. У типичных и факультативных ихтиофагов, потребляющих значительное количество белка, активность пептидаз значительно выше, чем у рыб, пища которых содержит меньшее количество высокомолекулярных белковых компонентов (Barrington, 1957; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Кузьмина, 1981, 2005, 2015; Сорвачев, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 2008, 2017; Bakke et al., 2011).

*Трансформационная функция.* Те же самые ферментные системы рыб обеспечивают реализацию трансформационной функции, которая делает возможным поток вещества и энергии в разных экосистемах и биосфере в целом. Трофическая иерархия и взаимосвязь организмов в контексте биоценозов, а также динамическое единство биосферы возможны только благодаря универсальному характеру строительных (аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты и т. п.) и функциональных (ферментативных и транспортных) систем. А. М. Уголев рассматривал биосферу, как трофосферу, функционирующую по принципу трофостата, в котором функции обратной связи играют многочисленные гидролазы консументов, их жертв и микрофлоры, обеспечивающие деполимеризацию органического вещества (Уголев, 1980, 1985, 1991). Ниже приведена схема функций пищеварительной системы у рыб на уровне организма, популяции и биоценоза (рис. 6.2).

Если учесть, что кормовые коэффициенты у рыб в южных регионах России составляют 5–6 (Фортунатова, Попова, 1973), а в центральных и северных – 8–12 (Иванова, 1966), становится ясным, насколько велик объем органического вещества, которое трансформируется в пищеварительном тракте рыб. При этом разрушаются не только белки, жиры и углеводы, являющиеся универсальными строительными и энергетическими компонентами гетеротрофов, но также целлюлоза растений и такие трудно гидролизуемые компоненты тканей беспозвоночных, как воска и хитин, (Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 2005; Bakke et al., 2011). В частности, одна популяция бычков *Enophrys bison* в течение года способна разрушить до 16 т хитина и сделать доступными для рециркуляции содержащиеся в нем углеводород, азот и другие элементы (Goodrich, Morita, 1977).

В настоящее время можно дать только общую оценку трансформационной функции. Однако ясно, что ее масштабы зависят не только от генетически закрепленных возможностей ферментативных систем трофических партнеров, но и от условий окружающей среды, включающей абиотические, биотические и, особенно, антропогенные факторы, которые способны значительно уменьшить активность различных гидролаз. Важно отметить, что анализ трансформационной функции должен включать оценку эффективности функционирования ферментных систем трофических партнеров в условиях естественной среды с учетом количества рыб и биомассы кормовых объектов, потребляемых конкретными популяциями рыб. Однако, несмотря на важность трансформационной функции пищеварительных гидролаз, количественная оценка ее роли в различных экосистемах в настоящее время затруднена из-за ряда методических трудностей и в значительной степени является задачей будущего.

Полифункциональная природа пищеварительной системы в значительной степени основана на полифункциональной природе пищеварительных ферментов. Трехфункциональная функция пищеварительных гидролаз (трофическая, защитная и трансформационная), по-видимому, существовала и у предшественников рыб. Действительно, данные, касающиеся структурных и функциональных характеристик желудочно-кишечного тракта у Cyclostomata и некоторых таксонах беспозвоночных, довольно близки к таковым рыб (Шмидт-Ниельсен, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 1999, 2005; Kuz'mina, 2017). Следует обратить внимание на тот факт, что, несмотря на внимание исследователей к процессам пищеварения рыб, многие проблемы все еще недостаточно разработаны и требуют тщательного изучения. Это особенно важно в связи с увеличением антропогенного пресса на водные экосистемы.

Действительно, снижение интенсивности гидролитических процессов вызывает ослабление трофической, защитной, трансформационной и других функций, что, в свою очередь, приводит к уменьшению численности популяций рыб, к изменению структуры биоценозов, а также к ухудшению качества товарной рыбы (Кузьмина, 1999 б).

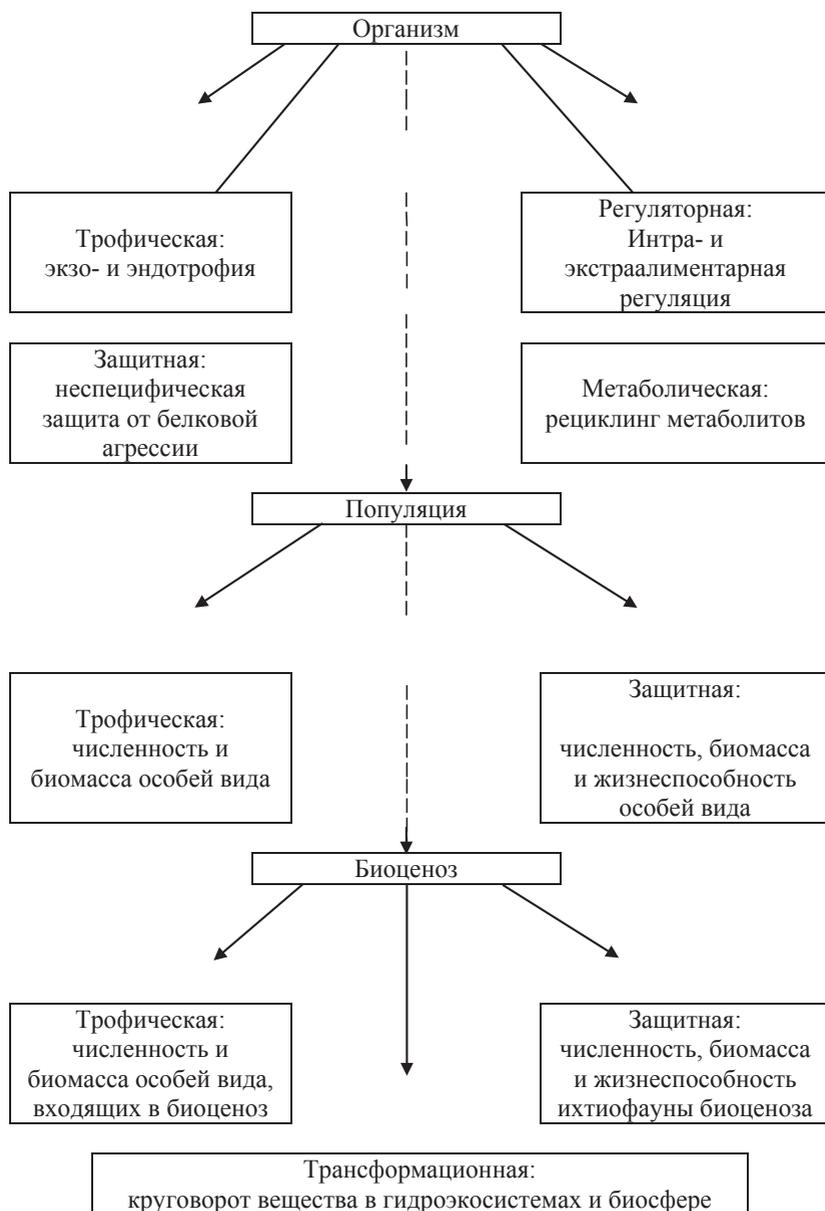


Рис. 6.2. Схема функций пищеварительной системы рыб на организменном, популяционном и биоценозическом уровнях (по: Кузьмина, 2005)

### **6.3. Классификация и роль адаптаций в функционировании пищеварительной системы**

Ранее подчеркивалось, что общепринятые классификации физиологических адаптаций, как правило, ориентированы на человека и касаются, главным образом, специализированных адаптаций (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2001, 2005). В связи с отсутствием классификации, учитывающей адаптивные перестройки на всех уровнях организации биологических систем, была предпринята ревизия существующих классификаций физиологических адаптаций (Кузьмина, 2001). Предложенная классификация типов физиологических адаптаций в значительной мере базируется на фундаментальных работах А. М. Уголева, в том числе на разработанной им концепции универсальных функциональных блоков (Уголев, 1982, 1985). В основу классификации физиологических адаптаций процесса экзотрофии положен принцип иерархичности:

1) адаптации элементарных функций – адаптивные изменения характеристик универсальных функциональных блоков, или эргомов – минимального количества молекул, способных выполнять физиологические функции,

2) локальные (подсистемные) адаптации – адаптации отдельных ассоциаций различных макромолекул (гетерополимеров), оргanelл, клеток, тканей и органов пищеварительной системы,

3) системные адаптации – адаптации всех структурных и функциональных элементов пищеварительной системы,

4) надсистемные адаптации – адаптивные изменения всех систем организма, прямо или опосредованно способствующих реализации трофической функции,

5) надорганизменные адаптации – а) виктимо-симбионтные адаптации – адаптации ферментных систем объектов питания, интестинальной и ассоциированной микрофлоры и других симбионтов пищеварительного тракта к условиям функционирования, б) популяционные адаптации – адаптивные изменения взаимодействия отдельных особей популяции в процессе поиска и потребления пищи, а также модификации других форм поведения, способствующие более эффективному питанию и функционированию пищеварительной системы, в) биоценотические адаптации – адаптации

всех звеньев трофической сети биоценоза, способствующие эффективной реализации процессов экзотрофии (Кузьмина, 2001).

*Адаптации элементарных функций.* Традиционно исследуемые адаптации ферментных систем пищеварительного тракта рыб и других животных относятся к категории адаптаций элементарных функций. В их основе лежат три описанных ранее универсальных механизма:

- 1) изменение типа макромолекул,
- 2) изменение концентрации макромолекул,
- 3) адаптивная регуляция функции макромолекул (Hochachka, Somero, 1973).

Эти механизмы имеют наибольшее значение для реализации полипотентности пищеварительных гидролаз.

Действительно, в многочисленных работах продемонстрирована возможность значительных адаптивных изменений различных характеристик свободных ферментов и ферментов, функционирующих в составе фермент-мембранных комплексов (см. вторую главу). Наибольшее многообразие механизмов, вовлекаемых в адаптивные перестройки пищеварительных ферментов, обнаружено при изучении характеристик одноименных гидролаз у рыб, обитающих при различной температуре, а также при их акклимации к разной температуре. Выявлены как генетически закрепленные свойства молекул, так и возможность быстрого изменения их характеристик. При этом в ряде случаев обнаружены изменения, связанные с особенностями экологии и филогенеза видов (Егорова и др., 1974; Уголев и др., 1986; Уголев, Кузьмина, 1993; Ugolev, Kuz'mina, 1993; Gelman et al., 1992, 1993; Kuz'mina, Gelman, 1997). Наибольшими адаптивными изменениями термостабильности, температурной зависимости и энергии активации характеризуются ферменты, находящиеся в начале цепи гликозидаз и пептидаз ( $\alpha$ -амилаза и пепсин) и обеспечивающие начальные этапы деградации полисахаридов и белков (Уголев, Кузьмина, 1993).

Наиболее убедительные доказательства адаптивного изменения температурной зависимости собственно кишечных гидролаз были получены при изучении характеристик щелочной фосфатазы у ряда видов рыб, обитающих в разных температурных зонах Атлантического океана (рис. 6.3).

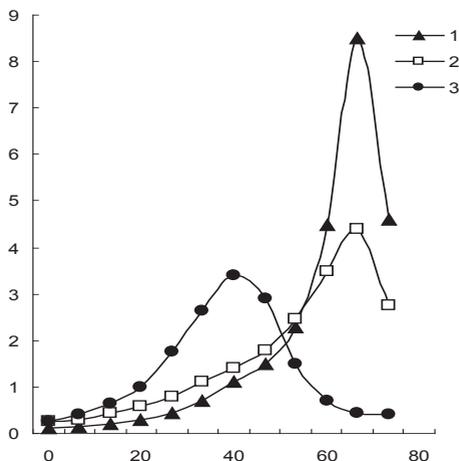


Рис. 6.3. Температурная зависимость щелочной фосфатазы кишечника у большой черной акулы *Etmopterus princeps* (1), угольной сабли *Aphanopus carbo* (2) и большеглаза *Epigonus telescopus* (3) (по: Gelman et al., 1993)

Обозначения: по оси абсцисс – температуры, °C, по оси ординат – ферментативная активность, мкмоль/(г·мин).

Оказалось, что температурный оптимум щелочной фосфатазы у глубоководной большой черной акулы *Etmopterus princeps*, обитающей при низкой температуре, равен 30°C, у большеглаза *Epigonus telescopus*, обитающего при высокой температуре – 60°C. При исследовании глубоководной угольной сабли *Aphanopus carbo* обитающей, как и акула, при низкой температуре, были выявлены парадоксально высокие значения температурного оптимума – 60°C. Изучение особенностей филогенеза этого вида рыб позволило объяснить этот феномен. Выяснилось, что угольная сабля 30 млн. лет тому назад обитала в условиях тропического шельфа и лишь позднее была оттеснена вглубь океана. За истекший период термостабильность белковых глобул щелочной фосфатазы, не изменилась, однако величина  $E_{\text{акт}}$  в зоне 0–10°C стала ниже, чем в зоне более высоких температур (Gelman et al., 1993).

В настоящее время принято считать, что температурные, в том числе холодовые, адаптации ферментов реализуются за счет генетически детерминированных и фенотипических механизмов. В первом случае изменения касаются первичной структуры молекул, в послед-

нем адаптивность изменения характеристик ферментов может быть связана как с прямым влиянием температуры на третичную структуру молекул фермента (Hochachka, Somero, 1973), так и с прямым или опосредованным влиянием эндокринной системы (Уголев, Кузьмина, 1993). Помимо этого изменение характеристик ферментов возможно благодаря существованию их множественных молекулярных форм (Evans, Ford, 1976; Raal et al., 1995; Хаблюк, Проскураков, 1988; Зогуля, 1996). Адаптации гидролаз, функционирующих в составе мембран энтероцитов, помимо этого достигаются при участии гидрофобных доменов ферментов и липидного матрикса мембран (Kemp, Smit, 1970; Егорова и др., 1974; Хюттер и др., 1986; Уголев и др., 1986; Egorova, Ugolev, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993; Ugolev, Kuz'mina, 1993; Buddington et al., 1993). Также выявлено значительное разнообразие жирнокислотного состава (ЖК) состава липидов слизистой кишечника рыб, наличие большого количества полиеновых ЖК и ЖК  $\omega$  3 типа, а также низкомолекулярных жирных кислот, имеющих низкую температуру плавления, что позволяет мембранам эффективно функционировать при низких температурах (Kemp, Smith, 1970; Кузьмина и др., 1982, 1984; Buddington et al., 1993). При этом независимо от типа питания рыб летом увеличивается количество насыщенных ЖК и ЖК  $\omega$  6 типа, зимой – ненасыщенных ЖК, особенно полиеновых ЖК и ЖК  $\omega$  3 типа (Кузьмина и др., 1982, 1984).

Кроме того, активность ферментов в значительной мере зависит от наличия в среде лигандов, способных влиять на конформацию активных центров, присоединяясь к их регуляторным сайтам. Функционированию при низкой температуре могут способствовать такие соединения, как глюкоза и мочевины (у хрящевых рыб) (Прошер, 1977). Тироксин, уровень которого выше у более подвижных видов (Плисецкая, 1975) также увеличивает холодоустойчивость рыб. Адреналин повышает холодоустойчивость тканей за счет десатурации жирных кислот, входящих в состав липидов (Крепс, 1981). Аргинин и продукты его метаболизма стабилизируют мембраны, в том числе лизосомальные, при холодовом стрессе (Ананян и др., 1991).

Наиболее подробно исследованы нутритивные адаптации, связанные с изменением активности ферментов в ответ на изменение концентрации соответствующих пищевых субстратов (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Kapoor et al., 1975; Уголев, Кузьмина,

1993; Кузьмина, 2005, 2015). Большинство приведенных в этих обзорах сведений касается генетически закрепленных адаптаций ферментных систем пищеварительного тракта, в частности, большей активности пептидаз у зоофагов, особенно у типичных ихтиофагов, гликозидаз – у фитофагов, а также значительной пластичности ферментных систем у видов с широким спектром питания. Филогенетическая диссоциация ферментов выявляется на самых ранних этапах онтогенеза – в период перехода рыб на внешнее питание (Кузьмина, Гельман, 1998). При этом описаны как адаптивные перестройки разных ферментных систем, так и адаптации в пределах одной ферментативной цепи, обусловленные изменением спектра питания и биохимического состава пищи рыб (Govoni et al. 1986; Ильина, Турецкий, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, Гельман, 1998).

Адаптации к составу пищи характерны как для активности одноименных ферментов у рыб, значительно различающихся по типу питания, так и у близких по таксономии и экологии видов. На примере ряда видов рыб сем. *Cyprinidae*, близких по характеру питания (бентофаги), продемонстрированы достаточно тонкие адаптации ряда карбогидраз ( $\alpha$ -амилаза, сахараза, ферменты группы мальтаз) к биохимическому составу объектов питания (Кузьмина, 1981; Ugolev, Kuz'mina, 1994). Адаптации пептидаз слизистой оболочки кишечника к характеру питания у тех же видов рыб выражены слабее, щелочной фосфатазы – отсутствуют (Уголев, Кузьмина, 1993).

Основным механизмом реализации нутритивных адаптаций гидролаз, по всей вероятности, является изменение количества синтезируемых ферментов в границах эволюционно закрепленной адаптивной нормы реакции. Кроме того, адаптивные перестройки могут осуществляться благодаря существованию множественных молекулярных форм ферментов (Evans, Ford, 1976; Хаблюк, Проскуряков, 1988; Зозуля, 1996), а также возможности быстрых конформационных переходов от одной формы молекулы к другой в результате воздействия модификаторов как алиментарной, так и неалиментарной природы (Уголев и др., 1986; Кузьмина, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993).

*Локальные (подсистемные) адаптации.* Проявление локальных адаптаций, охватывающих молекулярный, субклеточный, тканевой и органной уровни, весьма разнообразно. Хорошо известны

структурные адаптации, такие как форма и размер ротовой полости, глотки и желудка, форма и длина кишечника, наличие пилорического сфинктера и пилорических придатков и т. д. (Строганов, 1962; Кароор et al., 1975; Веригина, Жолдасова, 1982). Описаны и функциональные адаптации: большая кислотность желудочного сока у типичных ихтиофагов по сравнению с зоофагами, потребляющими беспозвоночных животных, обусловленная разным соотношением поли- и олигопептидов в пище, а также периодическая деятельность желудка у ихтиофагов (Шпарковский, 1986). Выявлены адаптивные перестройки проксимо-дистальных градиентов различных гидролаз (пептидазы,  $\alpha$ -амилаза, мальтаза, сахараза, щелочная фосфатаза) под влиянием пищевых нагрузок и изменения биохимического состава пищи (Уголев, Кузьмина, 1993). Механизмы этого типа адаптаций помимо описанных выше механизмов, реализующих адаптации элементарных функций, включают субстратное и парасубстратное регулирование. Первое обусловлено локальной субстратной нагрузкой – концентрацией того или иного пищевого субстрата в отдельных участках пищеварительного тракта и времени его контакта со слизистой, второе – наличием не субстратных (парасубстратных) регуляторов (Уголев и др., 1986). В ряде случаев наблюдается уменьшение активности ферментов (гликозидазы) при увеличении в пище мономеров (глюкоза), не нуждающихся в деполимеризации (Buddington, Hilton, 1987).

При исследовании рыб наиболее убедительно доказана важная роль субстратного регулирования, проявляющаяся как в изменении уровня активности соответствующих гидролаз, так и в характере проксимо-дистальных градиентов их активности (Уголев, Кузьмина, 1993). Также большую роль играют процессы саморегуляции на уровне взаимодействия ферментов и веществ, не являющихся субстратами исследуемой реакции, так называемых модификаторов. Последнее возможно благодаря тому, что многие пищеварительные гидролазы являются регулируемыми (Уголев, 1985; Egorova, Ugolev, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993). При исследовании влияния температуры на интенсивность транспорта глюкозы в кишечнике рыб выявлена возможность комбинированной регуляции, включающей изменение площади поверхности, плотности транспортеров и физико-химических свойств мембраны энтероцитов (Houpe et al., 1996).

*Системные адаптации.* В большинстве случаев при длительном воздействии различных факторов адаптивные изменения, перерастая рамки локальных адаптаций, охватывают все элементы пищеварительной системы. Наиболее ярко изменение структурных и функциональных характеристик всех тканей и органов пищеварительной системы проявляется в ответ на изменение спектра питания (Веригина, Жолдасова, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). Кроме того, описаны «гомеостатирующие» адаптации, обеспечивающие оптимизацию не пищеварительной, а других систем организма (Уголев и др., 1986). Системными также являются адаптивные изменения двигательной и электрической активности пищеварительного тракта (Шпарковский, 1986; 2000).

*Организменные (надсистемные) адаптации.* Примером структурных надсистемных адаптаций может служить изменение формы тела и анатомической организации всех систем организма, обусловленное характером питания, а также меньший объем крови у более подвижных пелагических рыб, по сравнению с придонными видами (Коржуев, 1964). Одним из наиболее ярких проявлений надсистемных адаптаций трофической функции является изменение соотношения процессов экзо- и эндотрофии на разных этапах годового цикла рыб. Механизмы регуляции соотношения процессов экзо- и эндотрофии в настоящее время не вполне ясны, однако не вызывает сомнения важная роль жидких сред, нервной и эндокринной системы (Кузьмина, 2005).

*Надорганизменные адаптации.* Этот тип адаптаций наиболее ярко проявляются на уровне ферментных систем объектов питания и энтеральной микробиоты. Так, у рыб, являющихся потенциальными объектами питания ихтиофагов, не только высока активность пептидаз пищеварительного тракта (Barrington, 1957; Kapoor et al., 1975; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993), но и лизосомальных катепсинов, а также цитозольных кальпаинов (Немова, 1996), способных расщеплять белки практически во всех тканях и органах собственного организма. У многих бентических организмов, таких как моллюски, напротив, выше уровень углеводов в тканях и активность гликозидаз (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). При этом продемонстрирована возможность значительного увеличения активности гидролаз жертвы за счет механизма индуцированного

аутолиза (Кузьмина, 2000, 2005, 2015). Также важную роль играют адаптации ферментов микрофлоры, способные разрывать химические связи в различных компонентах объектов питания, в том числе не гидролизующих ферментными системами рыб (Stickney, Shumway, 1974; Lindsay, Gooday, 1985; Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Clemets, 1997; Кузьмина, Скворцова, 2003; Кузьмина, 2005, 2015).

В категорию популяционных адаптаций включены изменения различных характеристик систем, связанных с реализацией трофической функции. Популяционные адаптации в контексте анализируемой проблемы это – закрепившаяся в процессе эволюции и передающаяся по наследству адаптивная норма реакции всех систем организма особей одного вида, связанная с реализацией трофической функции. Поскольку популяция – совокупность особей одного вида, способных обмениваться генетической информацией, но обособленная от других особей вида территориально, ясно, что именно в пределах популяции возможны генетически обусловленные адаптивные изменения тех или иных характеристик пищеварительной системы отдельных особей (Кузьмина, 2005, 2015).

*Биоценологические адаптации* касаются всех звеньев трофической сети биоценоза. Этот тип адаптаций наиболее труден для понимания механизмов их реализации из-за недостаточной фактологии (Георгиевский и др., 1975). Этот анализ затрудняет исключительное многообразие механизмов адаптивных перестроек у трофических партнеров и симбионтов, обитающих в пищеварительном тракте рыб. Биоценологические адаптации процессов пищеварения у рыб включают все формы биохимических и физиологических адаптаций. Ранее подчеркивалось, что механизмы надорганизменных адаптаций базируются на сочетании всех указанных выше типов адаптаций трофических партнеров и симбионтов (Кузьмина, 2005, 2015). При анализе эволюционных аспектов пищеварения обращалось внимание на необходимость функциональных подходов, которые должны базироваться на достижениях популяционной физиологии, предметом которой является вариабельность функциональных свойств особей, входящих в состав популяции (Уголев, 1985, 1988). В связи с вышесказанным было предложено следующее определение: «адаптация – спонтанно возникающая в процессе эволюции и закрепляющаяся путем естественного отбора совокупность реак-

ций, охватывающая все уровни организации живых систем, которая способствует их эффективному функционированию и поддержанию устойчивости макросистем в условиях динамичной среды (внутренней и внешней)» (Кузьмина, 2001). Это определение, несколько отличается от приведенного ранее (Уголев, Кузьмина, 1993), но хорошо согласуется с принципами, положенными в основу описанной выше классификации адаптаций (Кузьмина, 2001).

Таким образом, многочисленные факты свидетельствуют как о возможности адаптивного изменения характеристик элементарных функциональных блоков под влиянием различных факторов среды, так и о важной роли адаптаций в поддержании полипотентности и мультифункциональности пищеварительной системы, обеспечивающих устойчивость популяций рыб и биоценозов в целом.

#### **6.4. Заключительные замечания**

В настоящее время не вызывает сомнения множественность функций пищеварительной системы рыб (Кузьмина, 1995, 1999 б, 2005; Buddington et al., 1997; Grosell et al., 2011). Для пищеварительной системы рыб описаны два типа множественности: мультифункциональность и полипотентность. (Кузьмина, 1995, 1999 б, 2005). Мультифункциональность пищеварительной системы рыб базируется на мультифункциональности составляющих ее элементов, в первую очередь различных тканевых и клеточных структур. Помимо указанных выше базовых функций существуют рециклинг различных метаболитов, гомеостатирование гастро-энтеральной среды, регуляция непиварительных функций, а также участие пищеварительных гидролаз в адаптациях рыб к условиям жизнедеятельности (Кузьмина, 1999 б). Полипотентность пищеварительных гидролаз обусловлена выполнением различных функций одними и теми же молекулами, входящими в состав ферментных систем консументов, микрофлоры и объектов питания.

Мультифункциональность пищеварительной системы и полипотентность пищеварительных гидролаз, по всей вероятности, возникли на самых ранних этапах эволюции живого. Согласно А. М. Уголеву (1963, стр. 141) самые древние организмы были гетеротрофами, получающими органические вещества из окружающей среды. Уже

на этой стадии избыток органических материалов мог накапливаться в качестве своеобразных хранилищ, которые могли использоваться в случае недостаточного поступления органических веществ из окружающей среды. Мобилизацию этих запасов могли осуществлять гидролазы – самые древние среди всех известных ферментов.

Эта гипотеза объясняет выявленное впоследствии значительное сходство в первичной структуре некоторых пищеварительных гидролаз и пептидных гормонов (Weinstein, 1972; Track, 1973). По-видимому, древние предшественники современных организмов были способны выполнять трофические и регуляторные функции. Согласно Штейнеру и др. (1972), предшественник проинсулина также обладал ферментативными свойствами. Кроме того, важно отметить значительное сходство в биохимической организации прокариот и эукариот (Маргелис, 1983; Перцева, 1990). Предпосылки мультифункциональности пищеварительной системы и полипотентности пищеварительных гидролаз могли возникнуть приблизительно 3.5–2 млрд. лет тому назад еще у архибактерий (Фолсом, 1982, Маргелис, 1983). Этому способствовало наличие системы цАМФ, опосредующей сигналы о дефиците пищевых веществ у архебактерий (Фолсом, 1982), присутствие инсулина (Лейбсон, 1983) и рецепторов, участвующих в трансдукции химических сигналов (Перцева, 1989, 1990) у бактерий, а также возможность гормонального влияния на пищеварительные ферменты микрофлоры.

При этом изменения характеристик пищеварительных ферментов, как правило, являются адаптивными. Адаптации ферментов к условиям функционирования наблюдаются и на всех уровнях организации материи, в том числе популяционном и биоценоотическом. Действительно, изучение в идентичных методических условиях активности пищеварительных гидролаз у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам, позволило выявить нутритивные адаптации ферментов. Наибольшая активность пептидаз и наименьшая активность гликозидаз характерна для ихтиофагов, максимальная активность гликозидаз и минимальная активность пептидаз – для планкто- и бентофагов (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993). Эта закономерность отмечена при исследовании кишечной микрофлоры у рыб разных видов (Лубянские и др., 1989, Шивокене, 1989), а также у объектов питания рыб.

Действительно, объекты питания типичных ихтиофагов отличаются большим содержанием белка и большей активностью пептидаз, объекты питания макрофитофагов и бентофагов – большей активностью гликозидаз (Кузьмина, 2008, Кузьмина и др., 2016 б).

Адаптивные перестройки ферментных систем, реализующих трофическую функцию на биоценотическом уровне иерархически включают все известные в настоящее время типы и механизмы биохимических, физиологических и поведенческих адаптаций (Кузьмина, 1996). Эффективность защитной функции, реализуемой многоуровневой системой неспецифической механической и энзиматической защиты, также в значительной мере зависит от адаптированности пищеварительных гидролаз. Это же в равной мере относится и к регуляторной функции, обеспечивающейся взаимодействием нервной системы и гуморальных факторов, и в определенной степени связанной с процессами саморегуляции (на уровне взаимодействия ферментов с различными компонентами содержимого желудочно-кишечного тракта). Для обменной и гомеостатирующей функций, равно как рециклингов различных веществ, а также процессов эндотрофии чрезвычайно важны адаптации не только белковых, но и липидных компонентов мембран эпителиоцитов (Уголев, Кузьмина, 1993). Более высокие уровни организации иерархически включают все функции, характерные для организменного уровня. При этом для популяционного уровня наибольшее значение имеют трофическая и защитная функции, поскольку первая в значительной мере определяет биомассу особей, вторая – устойчивость к болезням и численность составляющих популяцию особей. Для биоценотического уровня наиболее важны трофическая функция (взаимодействие трофических партнеров и влияние состояния пищеварительной системы рыб на степень выедания кормовой базы), защитная функция, влияющая на численность видов, входящих в ихтиоценозы и трансформационная, обеспечивающая, благодаря активности пищеварительных гидролаз трофических партнеров и симбионтов, круговорот вещества в водных экосистемах (Кузьмина, 2001а, 2005).

Таким образом, мультифункциональность и полипотентность пищеварительной системы рыб обеспечивает не только эффективность трофических взаимоотношений рыб, симбионтов и объектов их питания, но и других функций, важных для функционирования

ихтиоценозов и экосистем. При этом особая роль принадлежит полипотентности структурно-функциональных блоков, так как именно благодаря множественности их функций реализуется принцип эффективности, особенно ярко проявляющийся при анализе различных функций пищеварительных гидролаз. Анализ трансформационной функции должен включать определение эффективности функционирования ферментных систем трофических партнеров в условиях реальной окружающей среды с учетом численности рыб и биомассы объектов питания, потребляемых отдельными популяциями и ихтиоценозами. Однако количественная оценка ее роли в различных экосистемах в настоящее время затруднена из-за целого ряда методических трудностей и в значительной мере является задачей будущего.

## Заключение

А. М. Уголев (1980, 1985, 1991), значительно расширивший понятие термина «трофология», подчеркивал, что цель науки о питании состоит в изучении общих закономерностей ассимиляции пищевых веществ на всех уровнях организации биологических систем, от клетки до биосферы в целом. В этом плане значительный интерес представляют рыбы, отличающиеся исключительным видовым разнообразием и многообразием спектра питания. Действительно, в настоящее время надкласс рыб включает более 20000 видов (Расс, 1971). Трофическая классификация включает до 13 основных экологических пищевых групп рыб, различающихся по доминирующим объектам питания и способу добывания корма (Поддубный, 1971; Никольский, 1974; Хиатт, 1983; Gerking, 1994; Pavlov, Kasumyan, 2002).

Несмотря на значительное сходство общих закономерностей, а также механизмов деградации пищи, соотношение механизмов пищеварения нутриентов у рыб из естественных экосистем существенно отличается от описываемых для высших позвоночных животных. Это в значительной мере обусловлено тем, что в естественных условиях исключительно важную роль играет механизм индуцированного аутолиза. Возможность значительного вклада ферментов жертвы в процессы пищеварения консументов существенно изменяет представления о требованиях к качеству жертвы, которое определяется не только ее биохимическим составом и калорийностью, но также способностью к аутодеградации, способствующей снижению энергетических затрат консумента на синтез собственных пищеварительных гидролаз (Кузьмина, 2005).

Вместе с тем корректно дифференцировать роль отдельных механизмов пищеварения в деградации пищевых субстратов у рыб и других позвоночных достаточно сложно. В первую очередь это относится к полостному пищеварению, реализуемому в кишечнике, поскольку в полости функционируют не только ферменты консумента, но и одноименные гидролазы, а также функционально близкие катепсины жертвы. Кроме того, важную роль играют гидролазы энτερальной и ассоциированной с объектами питания микробиоты. При оценке характеристик мембранного пищеварения активность фер-

ментов может быть завышена в результате определения активности одноименных гидролаз стромы, которую сложно отделить от эпителиального слоя слизистой оболочки. В некоторых случаях это относится и к ферментам, реализующим внутриклеточное пищеварение. Вместе с тем характеристики целого ряда гидролаз, описываемых, как мембранные, по-видимому, действительно отражают свойства ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение.

Наконец, до настоящего времени существуют разногласия в отношении ферментов, обеспечивающих симбионтное пищеварение. Однако выяснение вопроса о том, являются ли конкретные микроорганизмы истинными симбионтами или нет, по-видимому, не столь существенно для оценки эффективности процессов пищеварения. Это в первую очередь связано с высокими скоростями гидролиза нутриентов. Так, число оборотов наиболее «медленных» пептидаз (доли секунды) несопоставимо мало по сравнению с временем переваривания пищи в желудочно-кишечном тракте (несколько часов). Вследствие этого экстрацеллюлярные ферменты не только индигенной, но и транзитной микрофлоры могут участвовать в деградации пищевых субстратов.

Данные, касающиеся активности гидролаз энтеральной микробиоты, свидетельствуют о возможности их вклада в процессы пищеварения рыб. Однако в настоящее время корректная количественная оценка роли симбионтного пищеварения затруднена из-за необходимости культивирования микрофлоры, а также вариабельности уровня активности ферментов энтеральной микробиоты, обусловленной как различиями видового состава и численности микроорганизмов, так и разным пулом гидролаз, синтезируемых разными видами микроорганизмов. Однако поиск методов адекватной оценки вклада ферментов энтеральной микробиоты исключительно важен не только для углубления представлений о роли симбионтного пищеварения в процессах ассимиляции пищи и реализации трансформационной функции пищеварительных гидролаз, но и для выяснения роли микробиоты в процессах саморегуляции, лежащих в основе сложных форм адаптивной регуляции пищеварительной функции и процессов экзотрофии в целом (Кузьмина, 2005).

Как известно, для оценки эффективности процессов пищеварения у рыб и их объектов питания важна продукция мономеров

и других, небольших по размеру молекул, способных преодолевать эпителиальный барьер. Поскольку в гидролизе полимеров участвуют различные ферменты, причем их набор у разных видов консументов, их жертв, энтеральной и ассоциированной с объектами питания микрофлоры, как правило, различен, при оценке роли отдельных типов пищеварения целесообразно исследовать активность не отдельных ферментов, а суммарную активность ферментов, гидролизующих те или иные полимеры пищи. При этом сопоставление может считаться корректным, если работа проведена в одних и тех же методических условиях (Кузьмина, 2005, 2015).

Если роль ферментов жертвы и энтеральной микробиоты в увеличении эффективности начальных этапов ассимиляции пищи с той или иной долей погрешности оценить возможно, то роль полипотентности пищеварительных гидролаз в настоящее время можно представить лишь в самом общем виде. Вместе с тем отсутствие этого феномена потребовало бы для успешного функционирования организма рыб не только дополнительных затрат энергии, но и формирования дополнительных структур, что существенно повлияло бы на их продуктивность, а также характер и темпы эволюции. В связи с этим необходимо отметить, что одним из важнейших факторов эволюции систем, способствующих реализации процессов пищеварения, были соответствие биохимического состава потенциальных объектов питания потребностям консументов в энергетических и пластических компонентах, а также доступность пищи.

Сходство функциональных характеристик одноименных ферментов у значительно различающихся по таксономии консументов и их объектов питания в первую очередь обусловлено консервативностью структуры активного центра тех и других. При этом гидролазы, осуществляющие симбионтное пищеварение и индуцированный аутолиз, являются более древними по сравнению с ферментами рыб (Кузьмина, 1991). Действительно, различные классы беспозвоночных начали появляться 542 млн. лет тому назад, на протяжении разных периодов Палеозоя (моллюски и черви – в Кембрии, насекомые – в Перми). Предки рыб возникли в раннем Кембрии приблизительно 530 млн. лет тому назад. Появление хрящевых рыб (акул, скатов и химер) относят к середине Девона (около 395 млн. лет назад), костистых рыб – к началу Мезозоя и к Триасу (около 230 млн. лет тому назад).

Несмотря на разное время появления на Земле бактерий (Архей, 3.8–3.5 млрд. лет тому назад) и метазоа (1.8–1.5 млрд. лет тому назад) функциональные характеристики их гидролаз исключительно близки таковым позвоночных. При этом и прокариоты, и эукариоты обладают ферментами, способными разрушать основные энергетические компоненты (белки, жиры, углеводы). Помимо этого бактерии способны разрушать специфические компоненты растений. Поскольку в основе трофической пирамиды лежит кооперация (Заварзин, 2011), нельзя не согласиться с выводом о том, что «сообщества эволюционировали аддитивно, а не путем дивергенции». При этом необходимость выполнять сходные функции в условиях одних и тех же экосистем привела к выработке сходных механизмов адаптаций у организмов, далеко отстоящих друг от друга по филогенетической лестнице. Также не исключено, что на ранних этапах эволюции экосистем горизонтальный обмен генами был более широко распространен не только между бактериями (Syvanen, 1985), но и между бактериями и животными (Dunning, Hotopp, 2011), чем в настоящее время (Kuz'mina, 2017).

Также важно отметить, что до мелового периода, когда появились диатомовые водоросли и макрофиты (Тахтаджан, 1970), в пище древних организмов доминировали субстраты белковой природы. Это позволило предположить, что пищеварительные ферменты первоначально были связаны с деградацией белков и пептидов (Уголев, Кузьмина, 1993). Действительно, роль гликозидаз, обеспечивающих деградацию углеводов не могла быть значимой до появления специализированных групп макрофитофагов и бентофагов, пища которых содержит больше углеводов, чем пища ихтиофагов. При этом количество макрофитофагов в водных биоценозах незначительно, а у абсолютного большинства рыб в пище доминируют белковые компоненты. Помимо соответствия аминокислотного состава белков, желателен соответствием жирнокислотного состава липидов различных тканей трофических партнеров необходимо для поддержания высокой проницаемости мембран и быстрой передачи информации в условиях низких температур, что обеспечивается увеличением в составе различных липидов мембран полиненасыщенных жирных кислот.

В связи с этим необходимо отметить, что успешному функционированию пищеварительной системы рыб на разных этапах эво-

люции способствовали адаптации ферментов. При этом механизмы адаптивных перестроек пищеварительных ферментов аналогичны таковым других макромолекул (Hochachka, Somero, 1973). Вместе с тем наибольшего внимания заслуживают популяционные и биоценотические аспекты физиологических адаптаций. А. М. Уголевым (1961) была обозначена тесно связанная между собой триада – структура, функция и вызванный этой функцией эффект. Позднее подчеркивалось, что эволюция в значительной степени определяется принципом эффективности, когда полезный эффект, вследствие специализации сочетается с экономичностью функции, т. е. с меньшей ее метаболической стоимостью. При этом обращалось внимание на то, что функциональные подходы к анализу эволюции должны базироваться на достижениях популяционной физиологии, предметом которой является вариабельность функциональных свойств у особей, входящих в состав популяции, что предполагает наличие полезных и побочных эффектов (Уголев, 1985, 1988). Эта точка зрения позволяет дополнить онтогенетическую составляющую, делающую акцент на гомеостатических механизмах поддержания констант внутренней среды организма (Физиология адаптационных процессов, 1986), филогенетической составляющей, механизмы которой базируются не на точечных мутациях, а на варьировании распределения функциональных блоков (Уголев, 1988).

Есть основание надеяться, что развитие популяционной физиологии подтвердит широкую вариабельность функциональных признаков и возможность адаптивного изменения векторных процессов при участии описанных А. М. Уголевым механизмов: 1) введение в соответствующую систему нового функционального блока, 2) перестановка имеющихся функциональных блоков, 3) изменение соотношения между функциональными блоками (Уголев, 1988). Необходимость такого рода исследований диктуется возрастающим антропогенным прессом на водные экосистемы и появлением «индустриальных рас» рыб (Яковлев, 1992).

При анализе гомеостатических адаптаций подчеркивалась важность всего комплекса факторов, влияющих на структурно-функциональную организацию пищеварительной системы рыб. Лишь в этом случае становится понятной не только видимость ее «несовершенства» (низкий уровень ферментативной активности, преоб-

ладание механизмов простой и облегченной диффузии, меньшая зависимость от аэробных процессов) по сравнению с таковой высших позвоночных животных (Уголев, Кузьмина, 1993), но и ее важная роль в адаптациях организмов, входящих в популяции и биоценозы, к меняющимся факторам среды. Позднее обращалось внимание на значительную внутрипопуляционную вариабельность активности пищеварительных гидролаз у рыб разных видов (Кузьмина, 1994), а также возможность изменения ряда их характеристик в результате стрессирования химическими и физическими агентами. Особенно значительное влияние оказывает стрессирование в период раннего онтогенеза – как на этапе активации яйца и образования бластодиска, так и на этапе начала органогенеза (Кузьмина, Таликина, 1998; Голованова и др., 2006, 2013, 2016). Вместе с тем многочисленные данные свидетельствуют об относительной устойчивости пищеварительных ферментов рыб к воздействию различных токсических веществ (Кузьмина и др., 1999). Эти факты с одной стороны свидетельствуют о возможности изменения характеристик элементарных функциональных блоков под влиянием различных факторов среды, с другой – о важной роли пищеварительной системы в поддержании устойчивости популяций рыб и биоценозов в целом.

## Литература

Аминов А. И., Голованова И. Л., Филиппов А. А. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в организме беспозвоночных животных и молоди рыб // Биол. внутренних вод. 2013. № 4. С. 82–88.

Ананичев А. В. Пищеварительные ферменты рыб и сезонная изменчивость их активности // Биохимия. 1959. Т. 24В. № 6. С. 1033–1040.

Ананян А. А., Милютин Н. П., Шугалей В. С. Защитный эффект аргинина при холодовом стрессе и его возможный механизм // Биохимические аспекты холодовых адаптаций. Харьков, 1991. С. 3–10.

Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983. 367 с.

Бабкин Б. П. Секреторный механизм пищеварительные желез. // Л.: Медгиз, 1960. 777 с.

Баженова О. С. Особенности накопления и распределения тяжелых металлов в организме сига Северной Двины // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского Севера. Сыктывкар: ИБ УНЦ РАН, 2003. С. 10.

Бауман В. К. Всасывание двухвалентных ионов // Физиология всасывания. Гл. 4. Руководство по физиологии. Л.: Наука, 1977. С. 152–121.

Белова Н. А., Леднев В. В. Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на гравитропизм растений // Биофизика. 2001. Т. 46. № 1. С. 122–125.

Белова Н. А., Панчелюза В. А. Модель В. В. Леднева: теория и эксперимент. Биофизика. 2010. Т. 55. Вып. 4. С. 750–766.

Белова Н. А., Поцелуева М. М., Сребницкая Л. К., Знобищева А. В., Леднев В. В. Регуляция скорости образования активных форм кислорода в перитонеальных нейтрофилах мышей с помощью слабых магнитных полей. Биофизика. 2010. Т. 55. Вып. 4. С. 657–663.

Берман Ш. А., Саленице И. К. Пристеночное пищеварение у рыб // Вопр. ихтиологии. 1966. Т. 6. Вып. 4. № 41. С. 720–724.

Богатыренко Е. А. Характеристика культивируемых гетеротрофов микробного сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*: Автореф. дис.... канд. биол. наук. Владивосток, 2013. 23 с.

Бузинова Н. С. Действие триэтилоловохлорида на пищеварительную систему карпов // Оловоорганические соединения и жизненные процессы гидробионтов. М.: Изд. МГУ, 1975. С. 209–215.

Бузинова Н. С. Паталогические изменения активности пищеварительных ферментов рыб // Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. М.: Наука, 1983. С. 131–137.

Васильева Н. Е. Функциональная изменчивость кишечного эпителия позвоночных // Труды Ленинградского общества анатомов, гистологов, эмбриологов. Л., 1970. Вып. 2. С. 19–25.

Васильева Н. Е., Коровина В. М. Физиологическая и экологическая обусловленность гистологического строения средней кишки некоторых костистых рыб // Морфология низших позвоночных животных. Тр. Зоол. Ин-та. М.-Л., 1968. Т. 46. С. 190–206.

Веригина И. А., Жолдасова И. М. Эколого-морфологические особенности пищеварительной системы костистых рыб. Ташкент. Фан. 1982. С. 154.

Воробьев В. И. Микроэлементы и их применение в рыболовстве. М.: Пищ. пром-сть, 1979. 183 с.

Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.

Гальперин Ю. М., Лазарев П. И. Пищеварение и гомостаз. Л.: Наука, 1986. 304 с.

Ганеева М. В. Биогеохимическое распределение тяжелых металлов в экосистеме Рыбинского водохранилища // Современное состояние экосистемы Рыбинского водохранилища. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. С. 42–49.

Георгиевский А. Б., Петленко В. П., Сахно А. В., Царегородцев Г. И. Философские проблемы теории адаптации. М., 1975. 278 с.

Герасимов Ю. В., Чуйко Г. М., Павлов Д. Ф. Пищевое поведение леща при хроническом действии кадмия // Труды Всесоюзного совещания по вопросам поведения рыб. М., 1991. С. 196–203.

Грушко Я. М. Сточные воды гидролизных заводов и санитарная охрана водоемов. М: Медицина, 1979. 52 с.

Голованова И. Л. Анализ моно-, би- и полифакторного воздействия температуры, рН и кадмия на пищеварительные карбогидразы рыб // Биол. внутр. вод. 1997. № 2. С. 58–64.

Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на активность карбогидраз молоди рыб // Биол. внутр. вод. 2000. № 1. С. 132–137.

Голованова И. Л. Влияние различных факторов на устойчивость пищеварительных карбогидраз рыб к действию кадмия // Биол. внутр. вод. 2004. № 2. С. 76–83.

Голованова И. Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания // Автореф. дис. .... докт. биол. наук. СПб. 2006. 40 с.

Голованова И. Л., Комов В. Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вопр. ихтиологии. 2005. Т. 45. № 5. С. 695–701.

Голованова И. Л., Папченкова Г. А. Влияние гербицида “Раундап” на активность карбогидраз рачкового зоопланктона и молоди плотвы // Токсикол. вестн. 2009. № 4. С. 32–35.

Голованова И. Л., Таликина М. Г. Влияние низких концентраций хлорофоса в период раннего индивидуального развития на пищеварительные карбогидразы сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 2006. Т. 46. № 3. С. 412–416.

Голованова И. Л., Фролова Т. В. Влияние меди, цинка и кадмия на активность карбогидраз водных беспозвоночных // Биол. внутр. вод. 2005. № 4. С. 77–83.

Голованова И. Л., Урманцева Г. А. Влияние свинца на активность гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб // Труды КНЦ РАН. 2014. № 5. С. 195–199.

Голованова И. Л., Комов В. Т., Гремячих В. А. Гидролиз углеводов в кишечнике плотвы *Rutilus rutilus* (L.) при различном накоплении ртути в организме // Биология внутр. вод. 2008. № 3. С. 102–108.

Голованова И. Л., Комов В. Т., Кузьмина В. В. Влияние повышенного содержания ртути в корме на активность карбогидраз и протеиназ у различных гидробионтов // Биология внутр. вод. 2002. № 1. С. 85–89.

Голованова И. Л., Аминов А. И., Капшай Д. С., Голованов В. К. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. 2015. № 2. С. 90–97.

Голованова И. Л., Изюмов Ю. Г., Чеботарева Ю. В., Таликина М. Г. Отдаленные последствия раздельного и сочетанного влияния хлорофоса и переменного электромагнитного поля в период эмбриогенеза на эффективность гидролиза углеводов у сеголетков плотвы // Токсиколог. Вестн. 2006. № 5. С. 34–38.

Голованова И. Л., Кузьмина В. В., Чуйко Г. М., Ушакова Н. В., Филиппов А. А. Влияние полихлорированных бифенилов на активность протеиназ и карбогидраз в кишечнике молоди плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биология внутр. вод. 2011. № 2. С. 97–103.

Голованова И. Л., Таликина М. Г., Филиппов А. А., Чеботарева Ю. В., Изюмов Ю. Г. Влияние сверхмалых концентраций N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на ранний онтогенез плотвы *Rutilus rutilus*: Активность карбогидраз и кинетические характеристики гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков // Вопр. ихтиологии. 2008. Т. 48. № 2. С. 276–283.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Аминов А. И. Влияние гербицида Раундап *in vitro* на активность карбогидраз молоди рыб // Токсикол. вестн. 2011. № 5. С. 31–35.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Чеботарева, Ю. В. Изюмов Ю. Г., Крылов В. В. Влияние симулированной геомагнитной бури на активность пищеварительных гликозидаз у сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. Ихтиол. 2015. Т. 55. № 4. С. 590–595.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Чеботарева, Ю. В. Изюмов Ю. Г., Крылов В. В. Активность пищеварительных гликозидаз у сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.) после воздействия симулированной геомагнитной активности на эмбрионы // Труды КНЦ РАН. 2016. № 6. С. 81–90.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Голованов В. К. Влияние температуры, pH, и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность карбогидраз щуки *Esox lusius* L. и ее жертвы // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбн. хоз-во. 2011. № 2. С. 78–83.

Голованова И. Л., Филиппов А. А., Крылов В. В., Чеботарева Ю. В., Изюмов Ю. Г. Действие магнитного поля и меди на активность гидролитических ферментов у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопросы ихтиологии. 2013. Т. 53. № 2. С. 227–232.

Горомосова С. А., Шапиро А. З. Основные черты биохимии энергетического обмена мидий. М. Наука. 1989. 120 с.

Гульельми А. В., Зотов О. Д. О геомагнитном эффекте “мировых дней” // Геомагнетизм и аэрономия. 1986. Т. 26. С. 870–872.

Дину М. И. Влияние комплексообразующих способностей фульвокислот и гуминовых кислот на содержание лабильных фракций отдельных металлов // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы // Бюро. ИБВВ РАН. 2008. Т. 1. С. 26–30.

Егорова В. В., Иезуитова Н. Н., Тимофеева Н. М., Туляганова Е. Х., Гурман Э. Г., Щербаков Г. Г., Уголев А. М. Некоторые температурные характеристики и температурные адаптации ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение у пойкилотермных и гомойотермных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. 1974. Т. 10. № 3. С. 223–231.

Жукова А. И. Значение микроорганизмов для кормовой базы рыб // Вопр. ихтиол. 1957. Т. 9. С. 152–168.

Заварзин А. Г. Какосфера. М.: Ruthenica, 2011. 460 с.

Заяц Д. В. Днестр // География. 2000. № 39. С. 26–31.

Зенин С. В. Структурированное состояние воды как основа управления поведением и безопасностью живых систем: автореф. дис. докт. биол. наук М.: Ин-т биохим. физики РАН, 1999. 38 с.

Зозуля Л. В. Очистка и свойства пищеварительных ферментов белого толстолобика: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ростов н/Д, 1996. 22 с.

Золотарева Г. В. Влияние среды обитания на активность и рН-зависимость пищеварительных гидролаз у рыб, их потенциальных объектов питания и микробиоты: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Астрахань: Госун-т, 2015. 23 с.

Зоотарева Г. В., Кузьмина В. В., Залевская Т. Г., Шенцицкий В. А. Активность протеиназ химуса и энтеральной микробиоты в естественном для кишечника рыб диапазоне рН // Пробл. биол. продукт жив. 2013. № 2. С. 85–92.

Зубкова Л. А. Бактериальная флора органов и тканей сазана (*Cyprinus carpio* L.) // Труды КаспНИРХ. 1965. Т. 20. С. 117–121.

Зубкова Л. А. К вопросу о нормальной микрофлоре Волжского судака (*Lucioperca lucioperca*) // Труды КаспНИРХ. 1966. Т. 22. С. 81–85.

Зубова С. Г., Шитикова Ж. В., Поспелова Т. В. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке // Цитол. 2012. Т. 54. № 8. С. 589–602.

Иванова М. Н. Питание и пищевые взаимоотношения хищных рыб в Рыбинском, Горьковском и Куйбышевском водохранилищах: автореф. дис. канд. биол. наук. Л. 1966. 17 с.

*Иванова М. Н., Половкова С. Н., Кияшко В. И., Баканов А. И.* Питание и пищевые взаимоотношения рыб в водохранилищах Волжского каскада // Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. С. 55–77.

*Ивашкин В. Т., Минасян Г. Ф., Уголев А. М.* Теория функциональных блоков и проблемы клинической медицины. Л.: Наука, 1990. 303 с.

*Извекова Г. И.* Роль карбогидраз симбионтной микрофлоры в процессах пищеварения у цестод и их хозяев – рыб // Паразитол. 2009. Т. 43. № 2. С. 141–152.

*Ильина И. Д.* Физиолого-биохимические аспекты белкового питания личинок карпа: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ВНИИПРХ, 1986. 23 с.

*Ильина И. Д., Турецкий В. И.* Развитие пищеварительной функции у рыб // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27. № 5. С. 835–843.

*Канцерова Н. П., Ушакова Н. В., Крылов В. В., Лысенко Л. А., Немова Н. Н.* Модуляция активности  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеиназ беспозвоночных животных и рыб при воздействии слабых низкочастотных магнитных полей // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. № 4. С. 418–423.

*Кашулин Н. А.* Ихтиологические основы биоиндикации загрязнения среды тяжелыми металлами: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Петрозаводск, 2000. 42 с.

*Кашулин Н. А., Терентьев П. М.* Влияние медно-никелевого производства на содержание основных тяжелых металлов в рыбе // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Петрозаводск, 2004. С. 63–64.

*Комиссарчик Я. Ю., Уголев А. М.* Ультраструктура и возможное функциональное значение гликокаликса микроворсинок кишечных клеток // ДАН СССР. 1970. Т. 194. № 3. С. 731–733.

*Комов В. Т.* Причины и последствия антропогенного закисления озер: Курс лекций. Нижний Новгород: Вектор ТиС, 2007. 112 с.

*Комов В. Т., Степанова И. К., Гремячих В. А.* Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок. ИБВВ РАН. 2004. С. 99–123.

*Коновалов Ю. Д.* Реакция белоксинтезирующей системы рыб на наличие в их организме катионов ртути, кадмия, меди и цинка // Гидробиол. журн. 2001. Т. 37. № 1. С. 95–105.

*Копылов А. И., Косолапов Д. Б.* 2011. Микробная «петля» в планктонных сообществах морских и пресноводных экосистем. Ижевск: КнигоГрад, 332 с.

*Коржуев П. А.* Влияние высокой температуры на трипсин теплокровных и холоднокровных животных // Физиол. журн. 1936. Т. 21. № 3. С. 433–437.

*Корнева Ж. В., Бедняков Д. А.* Сравнительная характеристика ультраструктуры кишечного эпителия осетровых рыб // Биол. внутр. вод. 2011. № 4. С. 48–57.

*Королева И. М., Терентьев П. М.* Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы // Особенности накопления тяжелых металлов в рыбах оз. Чунозеро (Кольский полуостров) // Современные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН. 2008. С. 37–44.

*Коротелев С. Г., Неваленный А. Н., Левченко О. Е.* Характеристика пищеварительных ферментов белокорого палтуса *Hippoglossus stenolepis* Schmidt, 1904 и звездчатой камбалы *Platichthys stellatus* (Pallas, 1788) // Биол. моря. 2005. Т. 31. № 3. С. 221–224.

*Коротько Г.Ф.* Секретия поджелудочной железы. Краснодар: Изд. Куб. гос.мед. ун-т, 2005. 312 с.

*Костицина Н. В., Зиновьев Е. А., Ельченкова О. Н.* Особенность накопления тяжелых металлов в популяциях хариуса из рек Пермской области // Рыбные ресурсы Камско-Уральского региона и их рациональное использование. Пермь, 2001. С. 89–90.

*Котикова А. С., Ивченко Е. В., Голованова И. Л.* и др. Влияние физических и химических факторов в период эмбриогенеза на активность пищеварительных карбогидраз плотвы и их чувствительность к действию тяжелых металлов // Современные проблемы биологии, экологии, химии: Регион. сб. науч. тр. Ярославль: Ярослав. гос. ун-т, 2005. С. 103–110.

*Коштянец Х. С.* Основы сравнительной физиологии // М.-Л.: Изд. АН СССР, 1950. Т. 1. 524 с.

*Кравецкий П. А., Волкова И. В., Шипулин С. В.* Влияние нефтяной интоксикации на гидролитическую функцию пищеварительного тракта карповых рыб // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Матер. 3 Междунар. конф. Петрозаводск, 2010. С. 83–84.

*Крепс Е. М.* Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов // Л.: Наука, 1981. 339 с.

*Крупнова М. Ю.* Участие лизосомальных гидролаз в процессе эндогенного питания рыб // Сравнительная биохимия водных животных. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР, 1983. 192 с.

*Крылов В. В.* Модель действия геомагнитных бурь на биологические объекты на основе экспериментальных данных // Матер. VI Междунар. конгр. «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» СПб.: Оккервиль, 2012. С. 47.

*Крылов В. В., Зотов О. Д., Клайн Б. И.* Устройство для генерации магнитных полей и компенсации локального низкочастотного магнитного поля // Патент на полезную модель. RUS 108 640 от 13.05.2011.

*Кузьмина В. В.* Применение метода последовательной десорбции  $\alpha$ -амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб // Вопр. ихтиологии. 1976. Т. 16. Вып. 5. № 100. С. 944–946.

*Кузьмина В. В.* Особенности мембранного пищеварения у пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиологии. 1977. Т. 17. Вып. 1. № 102. С. 111–119.

Кузьмина В. В. Распределение активности  $\alpha$ -амилазы вдоль кишечника у пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиологии. 1979. Т. 19. Вып. 4. № 117. С. 698–709.

Кузьмина В. В. Сезонная и возрастная изменчивость активности  $\alpha$ -амилазы у леща // Вопр. ихтиологии. 1980. Т. 20. Вып. 1. № 120. С. 128–133.

Кузьмина В. В. Нутритивные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб // Журн. общ. биологии. 1981. Т. 42. № 2. С. 258–265.

Кузьмина В. В. Об оценке биохимического состава и калорийности энергетических компонентов кормовых объектов рыб // Ошибки методов гидробиологических исследований. Рыбинск. ИБВВ РАН. 1982. С. 135–143.

Кузьмина В. В. Влияние температуры на рН-функцию фосфатаз, функционирующих в кишечнике рыб // Вопр. ихтиологии. 1984. Т. 24. Вып. 1. С. 151–157.

Кузьмина В. В. Температурные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб // Журн. общ. биол. 1985. Т. 46. № 6. С. 824–837.

Кузьмина В. В. Регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб // Журн. общ. биол. 1987. Т. 48. № 6. С. 828–838.

Кузьмина В. В. Сезонная динамика активности некоторых карбогидраз и щелочной фосфатазы слизистой кишечника рыб // Вопр. ихтиологии. 1988. Т. 28. Вып. 5. С. 860–864.

Кузьмина В. В. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта некоторых видов пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиологии. 1990. № 30. Вып. 4. С. 668–677.

Кузьмина В. В. Особенности эволюции пищеварительно-транспортных функций у рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1991. Т. 27. № 2. С. 167–175.

Кузьмина В. В. Сравнительная физиология мембранного пищеварения // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1992. № 8. С. 145–150.

Кузьмина В. В. Роль индуцированного аутолиза в процессе пищеварения рыб // Физиол. ж. им. И. М. Сеченова. 1993. Т. 79. № 6. С. 102–108.

Кузьмина В. В. Вариабельность активности некоторых ферментов слизистой кишечника рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1994 Т. 30. № 6. С. 753–761.

Кузьмина В. В. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. 1995. Т. 35. № 1. С. 86–93.

Кузьмина В. В. Трофология рыб (физиолого–биохимические аспекты) // Биол. внутр. вод. 1996. № 1. С. 14–23.

Кузьмина В. В. Оценка полифакторных воздействий на активность протеиназ слизистой кишечника рыб // Биол. внутр. вод. 1997. № 2. С. 50–57.

Кузьмина В. В. Влияние температуры на пищеварительные гидролазы беспозвоночных животных // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1999а. Т. 35. № 1. С. 15–19.

Кузьмина В. В. Трофическая, защитная и трансформационная функции пищеварительной системы рыб // Вопр. ихтиологии. 1999б. Т. 39. № 1. С. 69–77.

Кузьмина В. В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. 2000а. Т. 373. № 1. С. 132–134.

Кузьмина В. В. Гормональная регуляция метаболизма и процессов экзотрофии у рыб. Полифункциональность и полипотентность // Журн. эвол. биохим. физиол. 2000б. Т. 36. № 6. С. 514–523.

Кузьмина В. В. Физиологические адаптации (на примере процесса экзотрофии у рыб) // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2001. Т. 37. № 3. С. 215–224.

Кузьмина В. В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука, 2005. 300 с.

Кузьмина В. В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Борок: ИБВВ РАН, 2008. 276 с.

Кузьмина В. В. Роль индуцированного аутолиза в процессах пищеварения молоди рыб на примере щуки *Esox lucius* // Вопр. Ихтиол. 2014. Т. 54. № 6. С. 734–740.

Кузьмина В. В. Процессы экзотрофии у рыб. Организация. Регуляция. Адаптации. М.: Полиграф-Плюс, 2015. 260 с.

Кузьмина В. В. Влияние цинка и меди на активность протеаз пищеварительного тракта, обеспечивающих неспецифическую защиту рыб // Труды ВНИРО. 2016. Т. 162. С. 65–73.

Кузьмина В. В. Роль функциональных блоков в эволюции процессов экзотрофии у позвоночных // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2017. № 3. С. 153–160.

Кузьмина В. В., Гельман А. Г. Особенности становления пищеварительной функции рыб // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 1. С. 113–122.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л. Влияние рН на активность карбогидраз слизистой кишечника рыб // Вопросы ихтиологии. 1980. Т. 20. Вып. 3(122). С. 566–571.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л. Влияние температуры на кинетические характеристики карбогидраз, осуществляющих мембранное пищеварение у рыб // Вопросы ихтиологии. 1983. Т. 23. Вып. 3. С. 135–146.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л. Влияние антропогенных факторов на активность пищеварительных ферментов рыб // Биол. внутр. Вод. 1997. № 3. С. 71–76.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л. Вклад карбогидраз объектов питания в процессы пищеварения хищных рыб // Вопр. ихтиологии. 2001 Т. 41. № 5. С. 691–698.

Кузьмина В. В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука, 2005. 300 с.

Кузьмина В. В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. (Ред. Ю. В. Герасимов). Борок: ИБВВ РАН, 2008. 276 с.

Кузьмина В. В., Морозова Е. Н. Влияние температуры на активность  $\alpha$ -амилазы у пресноводных костистых рыб // Вопросы ихтиол. 1976. Т. 16. Вып. 5(100). С. 944–946.

Кузьмина В. В., Неваленный А. Н. Влияние концентрации водородных ионов на активность карбогидраз пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. 1983. Т. 23. Вып. 1. С. 481–490.

Кузьмина В. В., Первушина К. А. Роль протеиназ энтеральной микробиоты в температурных адаптациях рыб и гельминтов // ДАН. 2003. Т. 391. № 1. С. 160–164.

Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г. Активность протеолитических ферментов потенциальных объектов питания хищных рыб. Влияние природных и антропогенных факторов // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. № 2. С. 239–248.

Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г. Бактерии желудочно-кишечного тракта и их роль в процессах пищеварения у рыб // Усп. совр. биол. 2002. Т. 122. № 6. С. 569–579.

Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г. Вклад протеолитических ферментов объектов питания в процессы пищеварения хищных рыб // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43. № 2 С. 209–214.

Кузьмина В. В., Смирнова Е. Г. Распределение активности ферментов между энтероцитами и отделенным от них апикальным гликокаликсом в различных отделах кишечника рыб (на примере леща) // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1990. № 88. С. 85–92.

Кузьмина В. В., Таликина М. Г. Влияние экстремальных воздействий в период раннего индивидуального развития на пищеварительные гидролиз плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 4. С. 524–529.

Кузьмина В. В., Ушакова Н. В. Протеиназы тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann) Рыбинского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 2. С. 277–283.

Кузьмина В. В., Цветкова В. А. Индуцированный аутолиз: роль в процессах пищеварения рыб // Биол. внутр. вод. 2001. № 3. С. 3–10.

Кузьмина В. В., Балабанова Л. В., Смирнов А.К. Ультраструктура кишечного эпителия у хрящевых рыб // Вопросы ихтиол. 2019. № 1.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л., Скворцова Е. Г. Вклад ферментов кормовых объектов в процессы пищеварения рыб // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 3. С. 384–393.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л., Скворцова Е. Г. Методические подходы к оценке вклада ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43. № 5. С. 705–710.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л., Скворцова Е. Г. Вклад протеиназ и карбогидраз в процессы пищеварения планкто- и бентоагов // Биол. внутр. вод. 2004. № 1. С. 99–107.

Кузьмина В. В., Комов В. Т., Куливацкая Е. А. Влияние ртути на пищевое поведение карпа *Cyprinus carpio* и эффекты серотонина // Пробл. биол. продукт. жив. 2016. № 1. С. 53–64.

Кузьмина В. В., Скворцова Е. Г., Шалыгин М. В., Влияние температуры на активность протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника у рыб разных экологических групп // Ж. эвол. биохим. физиол. 2012. Т. 48. № 2. С. 120–125.

Кузьмина В. В., Тарлева А. Ф., Грачева Е. Л. Влияние различных концентраций фенола и его производных на активность пептидаз кишечника рыб // Биол. внутр. Вод. 2017а. № 2. С. 104–111.

Кузьмина В. В., Тарлева А. Ф., Шенцицкий В. А. Влияние гербицида “Раундап” на активность пептидаз в кишечнике у рыб разных видов // Вопросы ихтиол. 2017б. № 4. С. 607–613.

Кузьмина В. В., Воронина У. В., Грачева Е. Г. Активность и температурные характеристики пептидаз слизистой оболочки кишечника у чехони *Pelecus cultratus* (L.) // Пробл. биол. продукт. жив. 2017 в. № 4. С. 40–47.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А. Влияние условий среды обитания на рН-зависимость протеиназ и гликозидаз кишечной микрофлоры карася // Экология. 2014а. № 4. С. 301–308.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А. Влияние рН на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб из Кучурганского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 2014б. Т. 54. № 5. С. 599–606.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А. Активность протеиназ объектов питания и сопутствующей микробиоты у рыб-ихтиофагов в широком диапазоне рН // Проблемы биологии продуктивных животных. 2015а. № 1. С. 42–52.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А. Влияние рН на активность гликозидаз потенциальных объектов питания бентофагов и сопутствующей микрофлоры // Биол. Внутр. Вод. 2015 б. № 2. С. 85–90.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А. Влияние рН на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у различающихся по экологии ихтиофагов // Вопр. Ихтиол. 2016 а. Т. 56. № 1. С. 102–108.

Кузьмина В. В., Золотарева Г. В., Шенцицкий В. А., Филипенко С. И. Роль объектов питания и микробиоты в процессах пищеварения рыб из разных экосистем. Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та. 2016 б. 196 с.

Кузьмина В. В., Ушакова Н. В., Крылов В. В. Влияние электромагнитного поля на активность протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб // Изв. РАН. Сер биол. 2015 в. № 1. С. 70–76.

Кузьмина В. В., Помазанская Л. Ф., Забелинский С. А., Пустовой В. К. Жирнокислотный состав слизистой кишечника пресноводных костистых рыб // Ж.эвол.биохим. и физиол. 1982. Т. 18. № 6. С. 558–563.

Кузьмина В. В., Помазанская Л. Ф., Забелинский С. А., Пустовой В. К. Особенности жирнокислотного состава слизистой кишечника рыб в летний период // Ж.эвол.биохим. и физиол. 1984. Т. 20. № 5. С. 542–545.

Кузьмина В. В., Ушакова Н. В., Крылов В. В., Петров Д. В. Влияние электромагнитной бури на активность протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб // Изв. РАН Сер. биол. 2014 в. № 2. С. 161–167.

Кузьмина В. В., Сворцова Е. Г., Лузанова К. А., Лебедев Д. С., Николаичев К. А. Влияние температуры на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб разных экологических групп // Пробл. биол. продукт. жив. 2014 в. № 4. С. 35–45.

Кузьмина В. В., Сворцова Е. Г., Шалыгин М. В. Влияние температуры на активность протеиназ потенциальных объектов питания рыб-ихтиофагов // Биол. внутр. вод. 2015. № 4. С. 76–83.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л., Ботяжова О. А., Шишин М. М., Смирнова Е. С. Влияние тяжелых металлов на пищевое поведение и пищеварение у пресноводных костистых рыб. // Тез. Всерос. конф. по инфекционной патологии и иммунологии, посвященной памяти Г. Д. Гончарова. М., 2003. С.64–65.

Кузьмина В. В., Комов В. Т., Гремячих В. Т., Русанова П. В. Активность пищеварительных гидролаз карпа *Cyprinus carpio* L. при различном содержании ртути в корме // Вопр. ихтиол. 2013. Т. 53. № 3. С. 358–366.

Кузьмина В. В., Шишин М. М., Корюкаева Н. В., Наумова Н. А., Ботяжова О. А. Влияние цинка и меди на активность протеиназ пищеварительного тракта у ряда видов пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. 2005. № 4. С. 102–109.

Леднев В. В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. 1996. Т. 41(1). С. 224–232.

Лейбсон Л. Г. Происхождение и эволюция эндокринной системы // Эволюц. физиология. Руководство по физиологии. Ч. 2. Л. 1983. С. 3–52.

Линник П. Н., Набиванец Б. И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л.: Гидрометеиздат, 1986. 270 с.

Лубянской В., Вербицкая Ю., Янкявичус К., Лясаускаене Л., Грибаускаене В., Тряпиене О., Юзоленене Ю., Ястюгинене Р., Бабянскас М., Янкаускаене Р. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма // Вильнюс: Моклас, 1989. 191 с.

Лубянской В., Янкявичус К. Роль микроорганизмов пищеварительного тракта в питании прудовых рыб (12. Микрофлора пищеварительного тракта рыб при естественном питании) // Тр. АН ЛитССР. 1975. Сер. В. Т. 4(72). С. 77–86.

Лукашев Д. В. Оценка фонового содержания тяжелых металлов в моллюсках *Lutnaea stagnalis* пресноводных экосистем Украины // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Борок: ИБВВ РАН, 2008. С. 60–63.

Лукьяненко В. И. Общая ихтиотоксикология. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 320 с.

- Лукьяненко В. И. Иммунология рыб. М.: Агропромиздат, 1989. 268 с.
- Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Канцерова Н. П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 482 с.
- Маргелис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир. 1983. 352 с.
- Мартынова Е. А. Киназа mTOR и ее роль в ответе клеток на стресс // Биол. мембраны. 2012. Т. 28. № 6. С. 446-452.
- Матей В. Е. Жабры пресноводных костистых рыб. Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. СПб. Наука. 1996. 204 с.
- Мелян Р., Кожушко А. Отчет совместной молдовоукраинской гидрохимической экспедиции 2011 года на реке Днестр (проект “Днестр III”). Руководители ОБСЕ, ЕЭК ООН и ЮНЕП в рамках инициативы “Окружающая среда и безопасность” (ENVSEC). 2012. 78 с. URL: [http://dniester.org/wpcontent/uploads/2012/03/Report\\_Dniester\\_expedition\\_2011\\_FINAL](http://dniester.org/wpcontent/uploads/2012/03/Report_Dniester_expedition_2011_FINAL)
- Мехед О. Б., Жиденко А. А. Влияние загрязнения воды гербицидами зенкор и раундап на обмен веществ в печени рыб сем. Cyprinidae // Гидробиол. ж. 2013. Т. 49. № 3. С. 82–88.
- Мечников И. И. О внутриклеточном пищеварении у кишечнорастворимых. Акад. собр. соч. М.: Изд. мед. лит. (1880) 1954. Т. 5. С. 9–10.
- Микряков В. Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН, 1991. 155 с.
- Микряков В. Р., Балабанова Л. В., Заботкина Е. А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с.
- Моисеенко Т. И. Оценка опасности в условиях загрязнения вод металлами // Водные ресурсы. 1999. 26. № 2. С. 186–197.
- Моисеенко Т. И. Экотоксикологический подход к оценке качества вод // Водные ресурсы. 2005. № 4. С. 410–424.
- Моисеенко Т. И., Даувантер В. А., Лукин А. А. и др. Антропогенные модификации экосистемы озера Имандра // М.: Наука, 2002. 403 С.
- Морозов И. А., Лысков Ю. А., Питран В. В., Хвьяля С. И. Всасывание и секреция в тонкой кишке: Субмикроскопические аспекты. М.: Медицина, 1988. 224 с.
- Москвичева А. В. Закономерности распределения и миграции металлов по трофическим цепям в водохранилище на реке Бугач: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Борок, 2002. 23 с.
- Мудра А. Е. Вміст заліза і магнію у печінці коропа за забруднення середовища солями важких металів // Мед. хім. 2004. Т. 6. № 3. С. 44–47.
- Мур Д. В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. М. Мир. 1987. 287 с.
- Мухин В. А., Новиков В. Ю. Выделение, очистка и характеристика комплекса протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschatica* // Тез. докл. 10-й науч.-техн. конф. профес.-препод. состава МГТУ. Мурманск: МГТУ. 1999. С. 354–355.

Неваленный А. Н., Бедняков Д. А. Влияние ионов кадмия в среде на уровень активности ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у карпа // Экология. 2004. № 2. С. 152–155.

Неваленный А. Н., Бедняков Д. А., Новинский В. Ю. Комплексное исследование особенностей процессов мембранного пищеварения у севрюги // Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. 2011. № 2. С. 93–98.

Неваленный А. Н., Туктаров А. В., Бедняков Д. А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. Астрахань: АГТУ, 2003. 152 с.

Неваленный А. Н., Зайцев В. Ф., Егоров С. Н., Минеев А. Е. Влияние тяжелых металлов на функционирование пищеварительных ферментов кишечных микроворсинок карпа // Материалы 2-й конференции по рыбохозяйственной токсикологии. СПб. 1991. С. 58.

Немова Н. Н. Катепсины животных тканей // Экологическая биохимия животных. Петрозаводск: КНЦ АН СССР, 1978. С. 76–88.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб // Петрозаводск: КНЦ РАН, 1996. 104 с.

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 210 с.

Никольский Г. В. Экология рыб. М.: Высш. школа, 1974. 357 с.

Никольский Н. Н. Всасывание сахаров // Физиология всасывания. Л.: Наука, 1977. С. 249–284.

Нюкканов А. Н. Накопление кадмия рыбами бассейна реки Вилюй // Ветеринария, 2003. № 12. С. 46–47.

Нюкканов А. Н. Воздействие природных экотоксикантов на гидробионты Республики Саха (Якутия): автореф. дис. .... докт. биол. наук. Красноярск, 2004. 30 с.

Одум Ю. Экология. Т. 2. М.: Мир, 1986. 376 с.

Ораевский В. Н., Кулешова В. П., Гурфинкель Ю. И, Гусева А. В., Рапопорт С. И. Медико-биологические эффекты естественных электромагнитных вариаций // Биофизика. 1998. Т. 43. Вып. 5. С. 844–848.

Остроумова И. Н. Биологические основы кормления рыб. СПб.: ГОСНИОРХ, 2001. 372 с.

Павлов И. П. Полное собрание сочинений. Т. 2. Кн. 2. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1951. 592 с.

Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. Новосибирск: Наука, 1987. 198 с.

Папченкова Г. А., Голованова И. Л., Ушакова Н. В. Репродуктивные показатели, размеры и активность гидролаз у *Daphnia magna* в ряду поколений при действии гербицида Раундап // Биология внутренних вод. 2009. № 3. С. 105–111.

Пегель В. А. Физиология пищеварения рыб. Томск.: Изд. Томского гос. Университета, 1950. 200 с.

Пегель В. А., Реморов В. А. Сравнительная характеристика амилолитической активности желудочно-кишечного тракта хищных и мирных рыб // Биохимические, фармакологические и токсикологические аспекты исследования адаптаций. Новосибирск, 1967.

Пегель В. А., Реморов В. А., Антипин А. С., Новак В. А. Исследование пристеночного и полостного пищеварения в кишечнике разных видов пресноводных рыб // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. 1971. Т. 94. № 10. С. 30–33.

Перевозников М. А., Богданова Е. А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. СПб.: ГосНИОРХ, 1999. 228 с.

Перечень рыбохозяйственных нормативов предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО, 1999. 304 с.

Перцева М. Н. Молекулярные основы развития гормонкомпетентности. Л.: Наука, 1989. 251 с.

Перцева М. Н. Существует ли эволюционное родство между хемосигнальными системами эукариот и прокариот? // Журн. эвол. биохим. физиол. 1990. Т. 26. С. 505–515.

Плисецкая Э. М. Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных. Л.: Наука, 1975. 215 с.

Погодаева Т. В., Смирнов В. В., Закулин Н. С., Титова Е. Ю. Тяжелые металлы (Zn, Fe, Cu, Mn, Pb) в тканях и органах байкальского омуля // Сиб. экол. журн. 1998. № 5. С. 477–483.

Подгурская О. В., Кавун В. Я., Лукьянова О. Н. Аккумуляция и распределение тяжелых металлов в органах мидии *Crenomytilus grayanus* из районов апвелленгов Охотского и Японского морей // Биология моря. 2004. Т. 30. № 3. С. 219–226.

Поддубный А. Г. Экологическая топография популяций рыб в водохранилищах. Л.: Наука, 1971. 312 с.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.

Пономарев В. И. Характеристика процессов пищеварения у рыб европейского севера. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Сыктывкар, 1993. 19 с.

Попов П. А. Содержание и характер накопления металлов в рыбах Сибири // Сиб. экологич. журн. 2001. Т. 8. № 2. С. 237–247.

Предеина Л. М., Федоров Ю. А., Бейсуг О. И., Предеин М. Н. Влияние ионов меди и ртути на показатели активности внеклеточных эстераз и щелочной фосфатазы в водных экосистемах // Биол. внутр. вод. 2006. № 2. С. 89–96.

Предеина Л. М., Федоров Ю. А., Предеин Н. М. Особенности влияния тяжелых металлов на активность щелочной фосфатазы и эстераз сестона

в модельных и природных экосистемах // Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы. Т. 2. Борок: ИБВВ РАН, 2008. С. 127–130.

*Проссер Л.* Температура // Сравнительная физиология животных. Т. 2. Гл. 9. М., 1977. С. 84–209.

*Разенков И. П.* Новые данные по физиологии и патологии пищеварения. М.: Медгиз, 1948. 288 с.

*Расс Т. С.* Жизнь животных. Рыбы. М.: Просвещение, 1971. Т. 4. Ч. 1. 655 с.

*Решетников Ю. С., Шатуновский М. И.* Теоретические основы и практические аспекты мониторинга пресноводных экосистем // Мониторинг биоразнообразия. М.: Наука, 1997. С. 26–32.

*Роева Н. Н., Сидоров А. В., Юровицкий Ю. Г.* Металлотioneины – белки, связывающие тяжелые металлы у рыб // Изв. РАН. Сер. Биол. 1999. № 6. С. 748–755.

*Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Костылев Ю. В.* Активность лизосомальных ферментов у взрослых самок озерного лосося *Salmo salar* L., в период преднерестового // Вопр. ихтиологии. 1980. Т. 20. Вып. 4. № 123. С. 713–718.

*Скворцова Е. Г., Егорова А. А., Кузьмина В. В.* Влияние температуры и кислотности среды на активность пептидаз у личинок хирономид – потенциальных объектов питания рыб-бентофагов // Пробл. биол. продукт. жив. 2016. № 4. С. 46–56.

*Слынько Ю. В., Кияшко В. И., Яковлев В. Н.* Рыбы вселенцы в бассейне Верхней Волги // Экологические проблемы Верхней Волги / под ред. А. И. Копылова. Ярославль: ИБВВ РАН, ИПЭЭ РАН, 2001. С. 84–86.

*Соболев К. Д.* Загрязнение тяжелыми металлами естественных и искусственных кормов и его влияние на рыб в условиях сбросных теплых вод: автореф. дис. .... канд. биол. наук. СПб, 2006. 24 с.

*Соловьев М. М., Кашинская Е. Н., Извекова Г. И., Глухов В. В.* Значения рН и активность пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте рыб озера Чаны (Западная Сибирь) // Вопр. ихтиологии. 2015. Т. 55. № 2. С. 207–214.

*Сорвачев К. Ф.* Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты). М., 1982. 247 с.

*Строганов Н. С.* Загрязнение вод и задача водной токсикологии. М., 1968. 38 с.

*Строганов Н. С.* Экологическая физиология рыб. М.: Изд. МГУ, 1962. 444 с.

*Столяр О. Б., Курант В. З., Хоменчук В. А., Грубинко В. В.* Характеристика низкомолекулярных серосодержащих соединений гепатопанкреаса карпа при интоксикации медью и цинком // Гидробиол. журн. 2003. Т. 39. № 4. С. 91–98.

*Субботина Т. И., Хадарцев А. А., Яшин М. А., Яшин А. А.* Воздействие вращающихся электромагнитных полей как фактор изменения протеолитической активности пепсина у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137. № 6. С. 714–716.

Суворова Е. Г., Треуцук Л. И. Морфология и гистохимия желудочно-кишечного тракта белого байкальского хариуса *Thymallus arcticus baicalensis* Dyb. // Вопр. ихтиол. 1973. Т. 13. Вып. 3(80). С. 523–534.

Сурякова В. В., Бондарева Л. Г., Бурмакина Г. В., Рубайло А. И. Новые подходы к выявлению источников поступления фенолов в поверхностные водоёмы // Доклады АН. 2011. Т. 441. № 6. С. 767–770.

Сухенко С. А. Ртуть в водохранилищах; новый аспект антропогенного загрязнения биосферы: Аналитический обзор // ИВЭП СО РАН. Новосибирск, 1995. Сер. «Экология». Вып. 36. 59 с.

Таликина М. Г., Комов В. Т., Гремячих В. А., Чеботарева Ю. В. Влияние ртути на морфофизиологические и цитоморфологические показатели молоди окуня *Perca fluviatilis* в хроническом эксперименте // Токсикол. вестн. 2006. № 4. С. 16–19.

Таликина М. Г., Комов В. Т., Чеботарева Ю. В., Гремячих В. А. Комплексная оценка длительного воздействия ртути на молодь плотвы *Rutilus rutilus* в экспериментальных условиях // Вопр. ихтиологии. 2004. Т. 44. № 6. С. 847–852.

Тарбенов А. А., Арианица Н. М., Перевозников М. А., Светашова Е. С. Исследование содержания тяжелых металлов в экосистеме реки Волхов // Проблемы экологической безопасности промысла рыб на внутренних водоемах. СПб: ГосНИОРХ, 2004. Вып. 330. С. 144–148.

Таштадзян А. Л. Происхождение и расселение цветковых растений // Л.: Наука, 1970. 145 с.

Тинсли И. Поведение химических загрязнителей в окружающей среде. М.: Мир, 1982. 280 с.

Трофимова Л. Н., Щербина Т. В., Щербина М. А. Активность пищеварительных ферментов карпа при различном уровне белка в рационах и ее изменение при смене рационов // Тр. ВНИИПРХ. М., 1975. Т. 24. С. 62–70.

Туктаров А. В. Влияние тяжелых металлов на пищеварительно-транспортную функцию кишечника осетровых рыб: автореф. канд. биол. наук. Астрахань, 2002. 21 с.

Уголев А. М. О существовании пристеночного (контактного) пищеварения // Бюл. эксперим. биол. мед. 1960. Т. 49. № 1. С. 12–17.

Уголев А. М. Пищеварение и его приспособительная эволюция. М., 1961. 306 с.

Уголев А. М. Пристеночное (контактное) пищеварение. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1963. 170 с.

Уголев А. М. Физиология и патология пристеночного (контактного) пищеварения // Л.: Наука, 1967. 230 с.

Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 358 с.

Уголев А. М. Трофология – новая междисциплинарная наука // Вестник АН СССР. 1980. № 1. С. 50–61.

*Уголев А. М.* Гипотеза о возможности эволюции и специализации функций на основе рекомбинации и транспозиции элементарных функциональных блоков // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1982. Т. 18. № 1. С. 11–26.

*Уголев А. М.* Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.

*Уголев А. М.* Некоторые принципы физиологической эволюции // Дарвинизм: история и современность. Л., 1988. С. 124–130.

*Уголев А. М.* Концепция универсальных функциональных блоков и дальнейшее развитие учений о биосфере, экосистемах и биологических адаптациях // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1990. Т. 26. № 4. С. 441–454.

*Уголев А. М.* Теория адекватного питания и тофология. СПб. Наука, 1991. 272 с.

*Уголев А. М., Кузьмина В. В.* Распределение активности пищеварительных гидролаз в эпителиальном, субмукозном и мышечно-серозном слоях кишечника рыб // ДАН СССР. 1992. Т. 326. № 3. С. 566–569.

*Уголев А. М., Кузьмина В. В.* Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. 238 с.

*Уголев А. М., Цветкова В. А.* Индуцированный аутолиз как важный механизм начальных стадий пищеварения в естественных условиях // Физиол. журн. 1984. Т. 70. № 11. С. 1542–1550.

*Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Тимофеева Н. М.* Энзиматический барьер тонкой кишки // Физиол. журн. 1992. Т. 78. № 8. С. 1–20.

*Уголев А. М., Тимофеева Н. Н., Груздков А. А.* Адаптации пищеварительной системы // Физиология адаптационных процессов. (Руководство по физиологии). М., 1986. Гл. 7. С. 371–480.

*Уголев А. М., Кузьмина В. В., Гурман Э. Г., Пономаренко Е. Д.* Глицеринизированные модели энтероцитов и некоторые их свойства // Физиол. журн. СССР. 1979. № 12. С. 1359–1363.

*Уголев А. М., Кузьмина В. В., Егорова В. В., Груздков А. А.* Мембранные пищеварительные гидролазы у различных видов рыб: свойства ферментов и ферментмембранных комплексов в связи с температурными адаптациями организма // Журн. общ. биол. 1981. Т. 42. С. 883–895.

*Уголев А. М., Кузьмина В. В., Роцина Г. М., Смирнова Л. Ф., Голованова И. Л., Груздков А. А.* Характеристика мембранного гидролиза и транспорта у рыб // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 3. С. 341–349.

*Ушаков В. Б.* Естественный отбор, температура среды и термоустойчивость клеток животных // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1974. Т. 10. С. 3–9.

*Ушаков В. П.* Эволюционное значение температурных адаптаций животных // Усп. совр. биол. 1982. Т. 93. С. 302–319.

*Ушакова Н. В.* Влияние тяжелых металлов (медь, цинк), температуры и pH на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта рыб и их потенциальных объектов питания: Дисс. канд. биол. наук. Борок, 2009. 153 с.

*Ушакова Н. В., Кузьмина В. В.* Активность протеиназ у рыб разных экологических групп и их потенциальных объектов питания // Вопросы ихтиологии. 2010. Т. 50. № 4. С. 554–560.

*Филипенко С. И.* Зообентос Кучурганского водохранилища: динамические процессы и использование в биологическом мониторинге. Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та, 2005. 160 с.

*Филиппов А. А., Голованова И. Л., Аминов А. И.* Влияние органических загрязнителей на пищеварительные ферменты рыб (обзор) // Биол. внутр. вод. 2013. № 2. С. 78–84.

*Флеров Б. А.* Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. СПб.: Наука, 1989. 144 с.

*Флеров Б. А.* (ред.) Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН, 2004. С. 248.

*Флеров Б. А., Томилина И. И., Кливленд Л., Баканов А. И., Ганеева М. В.* Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. 2000. № 2. С. 148–155.

*Фолсом К.* Происхождение жизни. М., 1982. 157 с.

*Фортулатова К. Р., Попова О. А.* Питание и пищевые взаимоотношения хищных рыб в дельте Волги // М.: Наука, 1973. 298 с.

*Хаблюк В. В.* Очистка и свойства пищеварительных ферментов из гепатопанкреаса карпа: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 1984. 20 с.

*Хаблюк В. В., Проскураков Т. М.* Пищеварительные ферменты карпа и особенности их физико-химических свойств // Современные проблемы экологической физиологии и биохимии рыб. Вильнюс, 1988. С. 249–270.

*Хитт К. Д.* Стратегия питания // Биоэнергетика и рост рыб / под ред. У. Хоара, Д. Рендолла, Дж. Бретта. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. С. 70–112.

*Хюттер Г. Я., Егорова В. В., Никитина А. А., Вершинина Е. А., Кузнецов В. В., Кузьмина В. В., Щербakov Г. Г.* Роль гидрофобной части мембранносвязанных ферментов (аминопептидазы и щелочной фосфатазы) в их функционировании // Изв. АН СССР. 1982. № 1. С. 56–69.

*Чахава О. В.* Гнотобиология. М: Медицина, 1972. 200 с.

*Чижевский А. Л.* Земное эхо солнечных бурь. М.: Идея, 1936. 366 с.

*Шатуновский М. И.* Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 288 с.

*Шалыгин М. В.* Роль протеиназ объектов питания и энтеральной микробиоты в температурных адаптациях пищеварительной системы рыб разных экологических групп: Дисс... канд. биол. наук. Борок.: ИБВВ РАН, 2013. 174 с.

*Шивокене Я. С.* Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас, 1989. 223 с.

*Шивокене Я., Мицкене Л., Милерене Э., Репечка Р., Вайтонис Г.* Микрофлора пищеварительного тракта гидробионтов Каунасского водохранилища // Ekologija (Vilnius). 1996. № 1. P. 29–34.

Ширинкина Ю. Микроэлементный состав органов и тканей леща Камского водохранилища // Экология: проблемы и пути решения. Пермь, 2002. Ч. 1. С. 154–156.

Шлыгин Г. К. Участье желудочно-кишечного тракта в общем обмене веществ // Руководство по физиологии: физиология пищеварения. Л.: Наука, 1974. С. 571–587.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: Приспособление к среде. Кн. 2 / под ред. Е. М. Крепс. М.: Мир, 1982. 384 с.

Шпарковский И. А. Физиология пищеварения рыб: двигательная функция. Л.: Наука, 1986. 176 с.

Шульман Г. Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 368 с.

Щербина М. А. Физиологические закономерности пищеварения у рыб в связи с морфологическими особенностями пищеварительного тракта и экологическими условиями (на примере *Cyprinus carpio* L. и *Salmo irideus* Gibb.): автореф. дис... док. биол. наук. М.: ВНИИПРХ, 1980. 52 с.

Шувалова Л. А., Островская М. В., Сосунов Е. А., Леднев В. В. Влияние слабого магнитного поля в режиме параметрического резонанса на скорость кальмодулин-зависимого фосфорилирования миозина в растворе // ДАН СССР. 1991. № 317(1). С. 227–230

Яблокова Е. В., Новиков В. В., Фесенко Е. Е. Действие слабых магнитных полей на флуоресценцию воды и водно-солевых растворов. Выделение и частичная характеристика флуоресцирующих фракций // Биофизика. 2007. Т. 52. № 2. С. 197–204.

Яковлев В. Н. «Индустриальная раса» плотвы *Rutilus rutilus* (Pisces, Cyprinidae) // Зоологический журнал. 1992. Т. 71. Вып. 6. С. 81–85.

Яржомбек А. А., Щербина Т. В., Здор В. И., Бекина Е. Н. Влияние формы веществ в кишечнике карпа на скорость их усвоения // Биологические основы рационального кормления рыбы (вып. 27). М.: ВНИИПРХ, 1980. С. 128–137.

Abernathy A. R., Sittel P. M. 1977. Mercury concentration by largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in recently impounded reservoirs // Bull. Environ. Contam. Toxicol. V. 17. No 5. Pp. 595–602.

Ackman R. G., Eaton C. A., Bligh E. G., Lantz A. W. Freshwater fish oils yields and composition of oils from reduction of sheep-shead, tullibee, maria, and alewife // J. Fish. Res. Board Canada. 1967. V. 24. No. 6. Pp. 1219–1227.

Adams D. H., Sonne C., Basu N., Dietz R., Nam D. H., Leifsson P. S., Jensen A. L. Mercury contamination in spotted sea trout, *Cynoscion nebulosus*: An assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health // Sci. Total Environ. 2010. V. 408. Pp. 5808–5816.

Akasofu S. I., Chapman S. Solar-Terrestrial Physics. Oxford: Clarendon Press, 1972. 901 p.

Alabaster J. S., Lloyd R. Water Quality Criteria for Freshwater Fish. London: Butterworths, FAO. United Nations, 1980. 297 p.

*Alarcón F. J., Díaz M., Moyano F. J., Abellán E.* Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*) // *Fish Physiol. Biochem.* 1998. V. 19. Pp. 257–267.

*Alarcon F. J., Martinez T. F., Diaz M., Moyano F. J.* Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) // *Hydrobiologia.* 2001. V. 445. Pp. 199–204.

*Ali A., Al-Ogaily S. M., Al-Asgah N. A., Gropp J.* Effect of sublethal concentration of copper on the growth performance *Oreochromis niloticus* // *J. Appl. Ichthyol.* 2003. V. 19. No 4. Pp. 183–188.

*Anderson W. G., Dasiewicz P. J., Liban S., Ryan C., Taylor J. R., Grosell M., Weihrauch D.* Gastro-intestinal handling of water and solutes in three species of elasmobranch fish, the white-spotted bamboo shark, *Chiloscyllium plagiosum*, little skate, *Leucoraja erinacea* and the clear nose skate *Raja eglanteria* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2010. V. 155 A. Pp. 493–502.

*Aoki H., Ahsan Md. N., Watabe S.* Molecular cloning and characterization of cathepsin B from the hepatopancreas of northern shrimp *Pandalus borealis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2003. V. 134B. Pp. 681–694.

*Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T.* Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1997a. V. 117B No. 4. Pp. 579–587.

*Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T.* Cathepsin B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1997b. V. 117B. No. 4. Pp. 601–605.

*Ash R.* Hydrolytic capacity of the trout (*Salmo gairdneri*) intestinal mucosa with respect to three specific dipeptides. *Compar. Biochem. Physiol.* 1980. V. 65B. No 1. Pp. 173–176.

*Ashie I. N. A., Simpson B. K.* Proteolysis in food myosystems – a review // *J Food Biochem.* 1997. V. 21. Pp. 91–123.

*Ásgeirsson B., Fox J. W., Bjarnason J. B.* Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua* // *Eur J Biochem.* 1989. V. 180. Pp. 85–94.

*Askarian F., Zhou Z., Olsen R. E., Sperstad S., Ringo E.* Culturable autochthonous bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens // *Aquacult. Res.* 2012. V. 326–329. Pp. 1–8.

*Askary Sary A., Mohammadi M.* Lead bioaccumulation and toxicity in tissue of economically fish species from river and marine water // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. Vol. 89, N 1. Pp. 82–85.

*Austin B.* The bacterial microflora of fish // *Scientific World J.* 2002. V. 2. Pp. 558–572.

*Austin B.* The bacterial microflora of fish, revised // *Sci World J.* 2006. V. 6. Pp. 931–945.

Authman M. M. N., Zaki M. S., Khallaf E. A., Abbas H. H. Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution // *J. Aquacult. Res. Devel.* 2015. V. 6. No. 4. Pp. 328–346. URL: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>

Ayrapetyan S. N., Grigorian K. V., Avanesyan A. S., Stamboltsian K. V. Magnetic fields alter electrical properties of solutions and their physiological effects // *Bioelectromagnetics.* 1994. V. 1. Pp. 133–142.

Bakke A. M., Glover Ch., Krogdahl A. Feeding, digestion and absorption of nutrients // *Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish* (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Acad. Press. 2011. V. 30. Pp. 57–110.

Baldisserotto B., Kamunde C., Matsuo A., Wood C. M. A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout // *Aquat. Toxicol.* 2004. V. 67. №1. Pp. 57–73.

Barrington E. J. W. The alimentary canal and digestion // *The physiology of fishes.* Acad. Press. New York-London. 1957. V. 1. Pp. 109–161.

Bay S. M., Grinstein D. J., Szalay P., Brown D. A. Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: biochemical effects of chronic exposure // *Aquat. Toxicol.* 1990. V. 16. № 4. Pp. 311–319.

Benitez L. V., Tiro L. B. Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos* // *Mar. Biol.* 1982. V. 71. Pp. 309–315.

Bebianno M. J., Santos C., Canario J., Gouveia N., Sena-Carvalho D., Vale C. Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo* // *Food Chem. Toxicol.* 2007. V. 45. No. 8. Pp. 1443–1452.

Belchior S. G. E., Vacca G. Fish protein hydrolysis by a psychrotrophic marine bacterium isolated from the gut of hake (*Merluccius hubbsi*) // *Can. J. Microbiol.* 2006. V. 52. Pp. 1266–1271.

Beninouna H., Jaspard-Versali M. F., Toussaint C., Jeuniaux Ch. A Comparative study of chitinase activity in digestive tract of *Serranus cabrilla* and *Serranus scriba* // *Biochem. Syst. Ecol.* 1986. V. 14. No. 4. Pp. 435–437.

Berntssen M. H. G., Hylland K., Wendelaar Bonga S. E., Maage A. Toxic levels of dietary copper in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr // *Aquat. Toxicol.* 1999. V. 46. No. 2. Pp. 87–99.

Berntssen M. H. G., Aatland A., Handy R. D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesion, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr // *Aquat. Toxicol.* 2003. V. 65. No. 12. Pp. 55–72.

Bertin L. Appareil digestif // *Traité de zoologie. Anatomie, systématique, biologie.* Ed Grassé Masson et C<sup>ie</sup>. Paris. 1958b. V. 13. № 2. Pp. 1248–1302.

Berzas Nevado J. J., Rodríguez Martín-Doimeadios R. C., Guzmán Bernardo F. J., Jiménez Moreno M., Herculano A. M., J.L.M. do Nascimento, Crespo-López M. E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review. *Environ. Internat.* 2010. V. 36. Pp. 593–608.

Bezerra R. S., Santos J. F., Paiva P. M. G., Correia M. T. S., Coelho L. C. B., Vieira V. L. A., Carvalho Jr. L.B. Partial Purification and Characterization of a Ther-

mostable Trypsin from Pyloric Caeca of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) // J. Food Biochem. 2001. V. 25. Pp. 199–210.

Bishop C. A., Odense P. H. Morphology of the digestive tract of the cod, *Gadus morhua* // J. Fish. Res. Board Canada. 1966. V. 23. №10. Pp. 1607–1615.

Bitterlich G. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich // J Fish Biol. 1985. V. 27. Pp. 103–112.

Blanchard J. P., Blackman C. F. Clarification and application of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with biological systems // Bioelectromagnetics. 1994. V. 15. Pp. 217–238.

Bloom N. S. 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue // Can. J. Fish Aquat. Sci. V. 49. Iss. 5. Pp. 1010–1017.

Bogue S. W., Glen, J. M. G. Very rapid geomagnetic field change recorded by the partial remagnetization of a lava flow // Geophys. Rev. Lett. 2010. V. 37. P. L21308.

Borggaard O. K., Gimsing A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. 2008. Pest. Manag. Sci. 64, 441–456.

Boudou A., Ribeyre F. Experimental study of trophic contamination of *Salmo gairdneri* two mercury compounds  $\text{HgCl}_2$  and  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  – analysis at the organism and organ level // Water Air Soil Pollut. 1985. V. 26. Pp. 137–148.

Brasitus T. A., Schachter D., Mamoiinaeas T. G. Functional interactions of lipids and proteins in rat intestinal microvillus membranes // Biochemistry. 1979. V. 18. No. 19. Pp. 4136–4144.

Brasitus T. A., Tall A. K., Schachter D. Thermotropic transitions in rat intestinal plasma membranes studied by differential scanning calorimetry and fluorescence polarization // Biochemistry. 1980. V. 19. Pp. 1256–1261.

Brendelberger H. Bacteria and digestive enzymes in the alimentary tract of *Radix peregra* (Gastropoda, Lymnaeidae) // Limnol. Oceanogr. 1997. V. 42. N 7. Pp. 1635–1638.

Brockerhoff H., Hoyle R. J. Hydrolysis of triglycerides by the pancreatic lipase of a skate // Biochem. Biophys. Acta. 1965. V. 98. Pp. 435–436.

Brown D. A., Bay S. M., Hershelman G. P. Exposure of scorpionfish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: effects of acute and chronic exposures on the cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc // Aquat. Toxicol. 1990. V. 16. No 4. Pp. 295–310.

Buddenbrock W. Vergleichende physiologie. Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere // Basel, Stuttgart: Ernährung. 1956. 677 s.

Bucking C., Wood C. M. The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of chyme in rainbow trout // Aquacult. Nut. 2009. V. 15. No. 3. Pp. 282–296.

Buddington R. K., Doroshov S. I. Development of Digestive Secretions in White Sturgeon Juveniles (*Acipenser transmontanus*) // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 83A. Pp. 233–238.

Buddington R. K., Hilton J. W. Intestinal Adaptation of Rainbow Trout to Changes in Dietary Carbohydrates // Am. J. Physiol. 1987. Pp. 489–496.

Buddington R. K., Krogdah A., Bakke-McKelle A. M. The Intestines of Carnivorous Fish: Structure and Functions and the Relations with Diet // Acta Physiol. Scand. 1997. V. 161. Suppl. 682. Pp. 67–80.

Buddington R. K., Kuz'mina V. V. Digestive system. Microscopic functional anatomy // The laboratory fish. Ch. 23. Eds G. K. Ostrander, J. Hopkins. Baltimore-Maryland. 2000 b. Pp. 379–384.

Buddington R. K., Weiher E. The application of ecological principles and fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract ecosystem // J. Nutr. 1999. V. 129. Pp. 1446–1450.

Buddington R. K., Williams C. H., Nagata Y. Fermentable fibers and the gastrointestinal tract bacteria: Comparisons of fiber types and mouse strains // Microb. Ecol. Health Disease. 2000. V. 12. Pp. 225–232.

Bury N. R., Walker P. A., Glover Ch. N. Nutritive metal uptake in teleost fish // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. Pp. 11–23.

Butler A. M., Aiton A. L., Warner A. H. Characterization of a novel heterodimeric cathepsin L-like protease and cDNA encoding the catalytic subunit of the protease in embryos of *Artemia franciscana* // Biochem. Cell Biol. 2001. V. 79. Pp. 43–56.

Cahill M. M. Bacterial flora of fishes: a review // Microb. Ecol. 1990. V. 19. Pp. 21–41.

Cahu C., Zambonino Infante J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae // Aquaculture. 2001. V. 200. Pp. 161–180.

Cahu C. L., Zambonino Infante J. L. Z., Peres A., Quazuguel P., Le Gall M. M. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: Effect on digestive enzymes // Aquacult. 1998. V. 161. No. 1–4. Pp. 479–489.

Cain K., Swan Ch. Barrier function and immunology // Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Acad. Press. 2011. V. 30. Pp. 112–135.

Campbell P. G. C., Stokes P. M. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1985. V. 42. Pp. 2034–2049.

Carvalho C. S., Fernandes M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH // Aquacult. 2006. V. 251. Pp. 109–117.

Capasso C., Lees W. E., Capasso A., Scudiero R., Carginale V., Kille P., Kay J., Parisi E. Cathepsin D from the liver of the Antarctic icefish *Chionodraco hamatus* exhibits unusual activity and stability at high temperatures // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1431. Pp. 64–73.

Castillo-Yáñez F. J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F. L., Navarrete-Del Toro M. A. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) // Compar. Biochem. Physiol. 2005. V. 140 B. Pp. 91–98.

Castillo-Yanez F. J., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Carreno F. L., Navarrete-Del Toro M. de los A., Lopez M. F. Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) // Food Chemistry. 2006. V. 99. Pp. 252–259.

Chakrabarti R., Rathore R. M., Kumar S. Study of Digestive Enzyme Activities and Partial Characterization of Digestive Proteases in a Freshwater Teleost, *Labeo rohita*, During Early Ontogeny // Aquacult. Nutrition. 2006. V. 12. Pp. 35–43.

Chan S. M., Wang W.-X., Ni I.-H. The uptake of Cd, Cr, and Zn by the macroalga *Enteromorpha crinita* and subsequent transfer to the marine herbivorous rabbitfish, *Signaus canaliculatus* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2003. V. 44. № 3. Pp. 0298–0306.

Chen L., Sun L. Cathepsin B of *Cynoglossus semilaevis*: identification, expression, and activity analysis // Compar. Biochem. Physiol. 2012. V. 161B. No. 1. Pp. 54–59.

Chevreuil M., Carru A., Chesterikoff A., Boët P., Tales E., Allardi J. Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Mn, Pb and Zn) micropollutants // Sci. Total Environ. 1995. V. 162. Pp. 31–42.

Chong A., Hashim R., Lee L. Ch., Ali A. Characterization and Protease Activity in Developing Discus *Symphysodon aequifasciata* Larva // Aquacult. Res. 2002. V. 33. Pp. 663–672

Clark J., MacDonald N. L., Stark J. R. Metabolism in marine flatfish II. Protein digestion in Dover sole (*Solea solea* L.) // Compar. Biochem. Physiol. 1985. V. 81B. No. 1. Pp. 217–222.

Clark, J., Murray, K. R., and Stark, J. R. Protease development in Dover sole (*Solea solea* L.), Aquaculture, 1986. V. 53. Pp. 253–262.

Clearwater S. J., Farag A. M., Meyer J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish // Comp. Biochem. Physiol. 2002. V. 132C. Pp. 269–313.

Clemets K. D. Fermentation and Gastrointestinal Microorganisms in Fishes // Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations (Eds. R.I. Mackie and B. A. White). New York: Chapman and Hall. Ch. 6. 1997. Pp. 156–198.

Coe R. S., Prevot M. Evidence suggesting extremely rapid field variation during a geomagnetic reversal // Geotektonika. 1989. V. 92. Pp. 292–298.

Cohen T., Gertler A., Birk Y. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*). I. Purification and properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase // Compar. Biochem. Physiol. 1981. V. 69B. Pp. 639–646.

Colin D. A. Relations entre la nature de l'alimentation et l'importance de l'activité chitinolytique du tube digestif de quelques téléostéens marins // Compt. Rendu Soc. Biol. 1972. V. 166. No. 1. Pp. 95–98.

Colin D. A., Pérès G. Etude comparée des systèmes enzymatiques chitininiques du tube digestif de quelques téléostéens marins // Ann. Inst. Michel Pacha. 1971. V. 4. Pp. 1–9.

Cornélissen G., Halberg F., Breus T., Syutkina E. V., Baevsky R., Weydahl A., Watanabe Y., Otsuka K., Siegelova J., Fiser B., Bakken E.E. Non-photoc solar associations of heart rate variability and myocardial infarction // *J. Atmos. Solar Terr. Phys.* 2002. V. 64. Pp. 707–720.

Corrêa C. F., de Aguiar L. H., Lundstedt L. M., Moraes G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences // *Compar. Biochem. Physiol.* 2007. V. 147A. Pp. 857–862.

Cox C. Glyphosate // *Journal of pesticide reform.* 2004. V. 24, № 4. Pp. 10–15.

Crane R. K., Boge G., Rigal A. Crane R. K., Boge G., Rigal A. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*) // *Biochim. Biophys. Acta* 1979. V. 554. No. 1. Pp. 264–267.

Crespo S., Nonnotte G., Colin D. A., Leray C., Nonnotte L., Audree A. Morphological and functional alterations induced in trout intestine by dietary cadmium and lead // *J. Fish. Biol.* 1986. V. 28. No 1. Pp. 69–80.

Cuvier-Péres A., Kestemont P. Development of Some Digestive Enzymes in Eurasian Perch Larvae *Perca fluviatilis* // *Fish Physiol. Biochem.* 2002. V. 24. Pp. 279–285.

Dabrowski K. The role of proteolytic enzymes in fish digestion // *Cultivation of fish fry and its live food* // *Eur. Maricult. Soc. Bradine Belgium. Special. Publ.* 1979. V. 5. Pp. 107–126.

Dabrowski K., Glogowski J. Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food // *Hydrobiologia (Hagua).* 1977a. V. 52. Pp. 171–174.

Dabrowski K., Glogowski J. The role of exogenic proteolytic enzymes in digestion processes in fish // *Hydrobiologia (Hagua).* 1977b. V. 54. Pp. 129–134.

Dai X., Shu M., Fang W. 2007. Histological and ultrastructural study of the digestive tract of rice field eel, *Monopoterus albus* // *J. Appl. Ichthyol.* V. 23. Pp. 177–183.

Dang Z., Lock R. A. C., Flik G., Wendelaar B. S. E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water // *Amer. J. Physiol.* 1999. V. 277. No. 1. Pt 2. Pp. R320–R331.

Dannevig B. H., Berg T. Temperature Adaptation of Lysosomal Enzymes in Fishes // *Compar. Biochem. Physiol.* 1978. V. 61B. Pp. 115–118.

Danulat E., Kausch H. Chitinase activity in the digestive tract of the cod, *Gadus morhua* (L.) // *J. Fish Biol.* 1984. V. 24. No. 2. Pp. 125–133.

Das K. M., Tripathy S. D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.) // *Aquacult.* 1991. V. 92. Pp. 21–32.

Dean R. T. Regulation and mechanisms of degradation of endogenous proteins by mammalian cells: general consideration. In: *Degradative processes in heart and skeletal muscle* (Ed. K. Wildenthal). Amsterdam etc.: Elsevier; North-Holland Biomed. Press. 1980. Pp. 3–30

*De Duve C.* The lysosomal concept. In: Lysosomes (Eds A.V.S. de Reuck, M.P.Cameron). Little, Boston: Brown and Co. 1963. Pp. 1–31.

*De Duve C., Wattiaux K.* Functions of Lysosomes // *Ann. Rev. Physiol.* 1966. V. 8. Pp. 435–492.

*Deivasigamani S.* Effect of herbicides on fish and histological evaluation of common carp (*Cyprinus carpio*) // *Inter. J. Appl. Res.* 2015. V. 1. No 7. Pp. 437–440.

*De la Parra A. M., Rosas A., Lazo J. P., Viana M. T.* Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions // *Fish Physiol. Biochem.* 2007. 33:223–231.

*Deguara S., Jauncey K., Agius .C* Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream // *J. Fish Biol.* 2003. V. 62. Pp. 1033–1043.

*Dendinger J. E., O'Connor K. L.* Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1990. V. 95B. Pp. 525–530.

*Diaz-Tenorio L. M., Garcia-Carreño F. L., Ángeles Navarrete del Toro M.* Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus* // *Invertebrate Biol.* 2006. V. 125. No. 2. Pp. 125–135.

*Dittrich B.* Temperature dependence of the activities of trypsin-like proteases in decapod crustaceans from different habitats // *Naturwissenschaften.* 1990. V. 77. Pp. 491–492.

*Dittrich B.* Comparative studies on the thermal properties of a trypsin-like protease in two hermit crabs // *Helgoländer Meeresuntersuchung: Helgoländer Meeresunters.* 1992a. V. 46. Pp. 45–52.

*Dittrich B.* Life under extreme conditions: aspects of evolutionary adaptation to temperature in crustacean proteases // *Polar Biol.* 1992b. V. 12. Pp. 269–274.

*Dixon M., Webb E. C.* Enzymes. 2nd edn. London; New York: Longmans, Green & Co. 1964. 950 p.

*Dobbins D. C., Thornton-Manning J., Jones D. D., Federle T. W.* Mineralization potential for phenol in subsurface soils // *J. Environ. Qual.* 1987. V. 16. No. 1. Pp. 54–58.

*Doe W. F.* The Intestinal Immune System // *Gut.* 1989. V. 30. Pp. 1679–1685.

*Doke S. N., Ninjoor V., Nadkarni G. B.* Characterization of cathepsin D from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica* // *Agric. Biol. Chem.* 1980. V. 44. Pp. 1521–1528.

*Doering J. A., Beitel S. C., Eisner B. K., Heide T., Hollert H., Giesy J. P., Hecker M.* Identification and response to metals of metallothionein in two ancient fishes: White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) // *Compar. Biochem. Physiol.* 2015. V. 171C. No. 1. Pp. 41–48.

*Donachie S. P., Saborowski R., Peters G., Buchholz F.* Bacterial digestive enzyme activity in the stomach and hepatopancreas of *Meganyctiphanes norvegica* (M. Sars, 1857) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995. V. 188. N. 2. Pp. 151–165.

Drastichova J., Syobodova Z., Luskova V., Machova J., Celechovskk O., Svestkova E. The effect of cadmium on haematological and biochemical indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Toxicol. Lett.* 2003. Vol. 144. Suppl. 1. P. 174.

Driscoll C. T., Mason R. P., Chan H. M., Jacob D. J., Pirrone N. Mercury as a global pollutant: Sources, pathways, and effects // *Environ. Sci. Technol.* 2013. V. 47. Pp. 4967–4983.

Duke S. O., Powles S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide // *Pest Manag. Sci.* 2008. V. 64. Pp. 319–325.

Dunning Hotopp J. C. Horizontal gene transfer between bacteria and animals // *Trends Genet.* 2011. V. 2. No. 4. Pp. 157–163.

Dupont M. J., McKay B. E., Parker G., Persinger, M. A. Geophysical variables and behavior: XCIX. Reductions in numbers of neurons within the parasolitary nucleus in rats exposed perinatally to a magnetic pattern designed to imitate geomagnetic continuous pulsations: implications for sudden infant death, Perceptual Motor Skills. 2004. V. 98. Pp. 958–966.

Egorova V., Ugolev A. Enzymology of Membrane Digestion, Membrane Digestion // *New Facts and Concepts.* Moscow: Mir. 1989. Pp. 117–160.

El-Shemy M. G. Characterization of Affinity-Purified Trypsin from Hybrid Tilapia (*Tilapia nilotica/aurea*) // *J. Food Biochem.* 1997. V. 21. Pp. 163–175.

Eisler R. Zinc hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service Patuxent Wildlife Research Center Laurel Maryland 20708. 1993. 126 p.

Eisler R. Zinc hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Department of the Interior Fish and Wildlife Service Patuxent Wildlife Research Center Laurel Maryland 20708. 1993. 126 p.

*Enzyme Nomenclature.* San Diego: Academic Press. 1992. 250 p.

Esakkiraj P., Immanuel G., Sowmya S. V., Iyapparaj P., Palavesam A. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus* // *Food Bioprocess Technol.* 2009. V. 2. Pp. 383–390.

Eshel A., Lindner P., Smirnoff P., Newtons S., Harpaz S. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater // *Compar. Biochem. Physiol.* 1993. V. 106A. No. 4. Pp. 621–634.

Evans R. E., Ford P. Alkaline Phosphatase Isosyme Patterns and Histochemistry in Adult and Differentiating Skate Spiral Valve // *Can. J. Zool.* 1976. V. 54. Pp. 1459–1465.

Ezeasor D. N., Stokoe W. M. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich // *J. Fish Biol.* 1981. V.18. No. 5. Pp. 527–544.

Fange R., Grove D. Digestion. Fish physiology (Eds. W. S. Hoar, D. J. Randall, J. R. Brett). New York, San Francisco, London: Acad. Press. 1979. V. 8. Pp. 162–260.

Fange R., Lundblad G., Lind J., Slettengren K. Chitinolytic enzymes in the digestive system of marine fishes // *Mar. Biol.* 1979. V. 53. No. 4. Pp. 317–321.

Farcaš T. A possible explanation for the differences in the fatty acid composition of fresh-water and marine fishes // *Ann. Boil. Tihany.* 1971. V. 38. Pp. 143–152.

Farkas A., Salánki J., Specziar A. Age- and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low-contaminated site // *Water Res.* 2003. V. 37. № 5. Pp. 959–964.

Fernández Gimenez A. V., García-Carreño F. L., Navarrete del Toro M. A., Fenucci J. L. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting // *Compar. Biochem. Physiol.* 2001. V. 130B. Pp. 3313–3338.

Fick A., Murisier. Über das Magenferment Kaltblutiger Tiere // *Würzl. Verh. Physiol. Med. Ges. NF* 1873. Bd 4. Ss. 120–121.

Filazi A., Baskaya R., Kim C., Hismiogullari S. Ege Metal concentrations in tissues of the Black Sea fish *Mugil auratus* from Sinop-Icliman, Turkey // *Hum. Exp. Toxicol.* 2003. V. 22. № 2. Pp. 85–87.

Filippov A. A., Golovanova I. L. The effect of organic toxicants on sensitivity glycosidases to Cu and Zn in juvenile roach // *Inland Water Biology.* 2012. No 1. Pp. 140–146.

Filipovic V., Raspor B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea // *Water Res.* 2003. V. 37. № 13. Pp. 3253–3262.

Filippov A. A., Krylov V. V., Golovanova I. L. Effect of magnetic storm on the temperature characteristics of digestive glycosidases in roach frylings // *Bulletin of ASTU. Ser. Fisheries.* 2014. No. 2. Pp. 101–105.

Filippov A. A., Aminov A. I., Golovanova I. L., Chebotareva Yu. V., Izyumov Yu. G., Krylov V. V. Effect of Magnetic Storm on the Sensitivity of Juvenile Roach Intestinal Glycosidase to Heavy Metals (Cu, Zn) and the Herbicide Roundup // *Inland Water Biol.* 2015. V. 8. No. 4. Pp. 417–420.

Fish G. R. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of Tilapia and Perch // *Hydrobiologia.* 1960. V. 15. No. 1–2. Pp. 161–178.

Folmar L. C., Sanders H. O., Julin A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates // *Arch. Environ. Contam. Toxicology*, 1979. V. 8. Pp. 269–278.

Frierson E. W., Foltz J. W. Comparison and estimation of absorptive intestinal surface areas in two species of cichlid fish // *Amer. Fish. Soc.* 1992. V. 121. Pp. 517–523.

Gale S. A., Smith S. V., Lim R. P., Jeffree R. A., Petocz P. Insights into the mechanisms of copper tolerance of a population of black-banded rainbowfish (*Melanotaenia nigra*) (Richardson) exposed to mine leachate, using  $^{64/67}\text{Cu}$  // *Aquat. Toxicol.* 2003. V. 62. № 2. Pp. 135–153.

Ganguly S., Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism // *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 2012. V. 22. Pp. 11–16.

García-Carreño F. L., Albuquerque-Cavalcanti C., Navarrete del Toro M. A., Zaniboni-Filho E. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality // Comp. Biochem. Physiol. 2002. V. 132B. Pp. 343–352.

Gatesoupe F.-J., Zambonino Infante J.-L., Cahu Ch., Quazuguel P. Early weaning of seabass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes // Aquacult. 1997. V. 158. Pp. 117–127.

Gatlin D. M., Wilson R. P. Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish // J. Nutr. 1983. V. 113. Pp. 630–635.

Gauthier G. F., Landis S. C. The relationship of ultrastructural and cytochemical features to absorptive activity in the goldfish intestine // Anatom. Rec. 1972. V. 172. Pp. 675–702.

Gawlicka A. K., Horn M. H. Trypsin Gene Expression by Quantitative *in Situ* Hybridization in Carnivorous and Herbivorous Prickleback Fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects // Physiol. Biochem. Zool. 2006. V. 79. No 1. Pp. 120–132.

Gawlicka A., Leggiadro C. T., Gallant J. W., Douglas S. E. Cellular expression of the pepsinogen and proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by *in situ* hybridization // J. Fish Biol. 2001. V. 58. Pp. 529–536.

Gelman A., Makady S., Cogan U. The effect of seasonal changes on the activity of intestinal alkaline phosphatase of pike perch, *Lucioperca lucioperca* and bream, *Abramis brama* // Fish Biol. 1984. V. 25. Pp. 207–212.

Gelman A. G., Cogan U., Mokady S. The thermal properties of fish // Compar. Biochem. Physiol. 1992. V. 101B. Pp. 205–208.

Gelman A. G., Cogan U., Mokady S. Enzymes as Indicators of Evolution and Potential Adaptation of Fish. // Trends Comp. Biochem. Physiol. (India). 1993. Pp. 1241–1253.

Gelman A. G., Cogan U., Mokady S. Enzymes as indicators of evolution and potential adaptation of fish // Trends in Comparative biochemistry and physiology. Eds. J. Menon, J. L. Alexander. India. 1993. Pp. 1241–1253.

Gelman A., Kuz'mina V., Drabkin V., Glatman L. Temperature dependent characteristics of intestinal glycyl-L-leucine dipeptidase in boreal zone fish // Compar. Biochem. Physiol. 2003. V. 136 B. Pp. 323–329.

Gelman A. G., Kuz'mina V. V., Drabkin V., Gladman M. Temperature adaptations of fish digestive enzymes // Feeding and digestive functions in fishes. (Eds J. E. P. Cyrino, D. P. Bureau, B. G. Kapoor). Enfield (NF), Jersey, Plymouth: Sci. Publ. 2008. Pp. 155–226.

Gerking S. D. Feeding ecology of fish. San-Diego: Acad. Press. 1994. 416 p.

German D. P. Inside the guts of wood-eating cat fishes: can they digest wood? // J. Comp. Physiol. 2009. V. 179 B. Pp. 1011–1023.

German D.P., Bittong R. A. Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes // J. Compar. Physiol. 2009. V. 179 B. Pp. 1025–1042.

German D. P., Sung A., Jhaveri P. K., Agnihotri R. More than one way to be an herbivore: convergent evolution of herbivory using different digestive strategies in prickleback fishes (family Stichaeidae) // Zool. 2015. V. 118. Pp. 161–170.

Ghosh P., Ray A. K. Effects of duckweed (*Lemma polyrrhiza*) meal incorporated diet on enzyme producing autochthonous gut bacteria in fingerling mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) // Int. J. Fisher. Aquat. Stud. 2014. V. 2. N. 1. Pp. 72–78.

Ghosh K., Roy M., Kar N., Ringø E. Gastrointestinal bacteria in rohu, *Labeo rohita* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae): scanning electron microscopy and bacteriological study // Acta Ichthyol. Piscat. 2010. V. 40. N. 2. Pp. 129–135.

Ghosh K., Sen S. K., Ray A. K. Characterization of bacilli isolated from gut of rohu, *Labelio rohita*, fingerlings and its significance in digestion // J. Appl. Aquacult. 2002. V. 12. Pp. 33–42.

Giesy J. P., Giesy J. P., Dobson S., Solomon K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 2000. V. 167. Pp. 35–120.

Gildberg A. Aspartic Proteinases in Fishes and Aquatic Invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. 1988. V. B 91. Pp. 425–435.

Gildberg A., Olsen R. L., Bjarnason J. B. Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*) // Compar. Biochem. Physiol. 1990. V. 96B. Pp. 323–330.

Gill T. S., Tewari H., Pande J. *In Vivo* and *in Vitro* Effects of Cadmium on Selected Enzymes in Different Organs of the Fish *Barbus Pethia conchoniui* Ham. (Rosy barb) // Compar. Biochem. Physiol. 1991. V. 97. No. 3. Pp. 501–505.

Gladyshev M. I., Emelianova A. Y., Kalachova G. S., Zotina T. A., Gaevsky N. A., Zhilenkov M. D. Gut content analysis of *Gammarus lacustris* from a Siberian lake using biochemical and biophysical methods // Hydrobiol. 2000. V. 431. Pp. 155–163.

Glover Ch. N., Hogstrand Ch. Amino acid modulation of in vivointestinal zinc absorption in freshwater rainbow trout // J. Exp. Biol. 2002. V. 205. Pp. 151–158.

Golovanova I. L., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effect of cadmium, naphthalene, and DDVP on gut carbohydrase activity in bream (*Abramis brama* L.) and *Mozambique tilapia* (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Bull Environ Contam Toxicol. 1994. V. 52. Pp. 338–345.

Golovanova I. L., Gobzhelina T. E., Kuz'mina V. V., Pavlov D. F., Chuiko G. M. *In vitro* effects of cadmium and DDVP (Dichlorvos) on intestinal carbohydrase and protease activities in freshwater teleosts // Compar. Physiol. Biochem. 1999. V. 122C. No 1. Pp. 21–25.

Golovanova I. L., Philippov A. A., Chebotareva Yu. V., Izyumov Yu. G., Krylov V. V. Delayed effect of geomagnetic storm simulation on size, mass and activity of digestive glycosidases in roach (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) underyearlings // J. Appl. Ichthyol. 2017. V. 33. Pp. 291–299.

Goodrich M. D., Morita R. Y. Incidence and Estimation of Chitinase Activity Associated with Marine Fish and Other Estuarine Samples // Mar. Biol. 1977. V. 41. No. 4. Pp. 349–353.

Gorbi S., Baldini Ch., Regoli F. Seasonal Variability of Metallothioneins, Cytochrome P450, Bile Metabolites and Oxyradical Metabolism in the European Eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and Striped Mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2005. V. 49. No.1. Pp. 62–70.

Govoni J. J., Boehlert G. W., Watanabe Y. The physiology of digestion in fish larvae // Environ. Biol. Fish. 1986. V. 16. No. 1–3. Pp. 59–77.

Granger B., Baker R. F. Electron microscope investigation of the striated border of intestinal epithelium // Anat. Rec. V.107. No 4. Pp. 423–436.

Grippo, M. A., Heath, A. G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnow (*Pimephales promelas*) // Ecotox. Environ. Safety. 2003. Vol. 55. Pp. 187–198.

Grossel M. The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance // Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 136–165.

Grosell M., Farrell A. P., Brauner C. J. (Eds). Feeding, digestion and absorption of nutrients // Fish physiology. In: The Multifunctional Gut of Fish. Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. 447 p.

Guerard F., Le Gal Y. Characterization of a chymosin-like pepsin from the dogfish *Scyliorhinus canicula* // Compar. Biochem. Physiol. 1987. V. 88 B. No. 3. Pp. 823–827.

Guionie O., Moallic C., Niamké S., et al. Identification and Primary Characterization of Specific Proteases in the Digestive Juice of *Archachatina ventricosa* // Compar. Biochem. Physiol. 2003. V. 135B. 503–551.

Gupta P. K., Sastry K. V. Effect of mercuric chloride on enzyme activities in the digestive system and chemical composition of liver and muscles of the catfish, *Heteropneustes fossilis* // Ecol. Toxicol. Environ. Safety. 1981. V. 5. Pp. 389–400.

Hammock D., Huang C. C., Mort G., Swinehart J. H. The effect of humic acid on the uptake of mercury (II), cadmium(II), and zinc(II) by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs // Arch. Environ. Contain. Toxicol. 2003. V. 44. № 1. Pp. 83–88.

Hagi T., Tanaka D., Iwamura Ya., Hoshino T. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish // Aquaculture. 2004. V. 234. Pp. 335–346.

Hall B. D., Bolalý R. A. Furge R.J.P. et al. 1997. Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish // Water Air Soil Pollut. V. 100. No. 1–2. Pp. 13–24.

Hamid A., Sakata T., Kakimoto D. Microflora in the alimentary tract of gray mullet: 4. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria // Bull. JaP. Soc. Sci. Fish. 1979. V. 45. No. 1. Pp. 99–106.

Hammock D., Huang C. C., Mort G., Swinehart J. H. The effect of humic acid on the uptake of mercury (II), cadmium(II), and zinc(II) by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs // Arch. Environ. Contain. Toxicol. 2003. V. 44. № 1. Pp. 83–88.

Hanada T., Noda N.N., Satomi Y., Ichimura Y., Fujioka Y., Takao T., Inagaki F., Ohsumi Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. Pp. 37298–37302.

Handy R. D., Mubsonda M. M., Phillips C., Falla S. J. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine // *J. Exp Biol.* 2000. V. 203. Pp. 2365–2377.

Hansen J. A., Lipton J., Welsh P. G. Relative sensitivity of bull trout (*Salvelinus confluentus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to acute copper toxicity // *Environ. Toxicol. Chem.* 2002. 21. No 3. Pp. 633–639.

Harayashiki C.A.Y., Varela A. S. Jr, de Souza Machado A. A., da Costa Cabrera L., Primel E.G., Bianchini A., Corcini C. D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water // *Aquat. Toxicol.* 2013. V. 142. Pp. 176–184.

Harrison S. E., Klaverkamp J. F. Uptake, elimination and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchell) // *Environ. Toxicol. Chem.* 1989. V. 8. Pp. 87–97.

Harrison S. E., Klaverkamp J. F., Hesslein R. H. Fates of metal radiotracers added to a whole lake: Accumulation in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*) // *Water Air Soil Pollut.* 1990. V. 52. No. 3–4. Pp. 277–294.

Hau P. V., Benjakul S. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Priganthus macracanthus*) // *J. Food Biochem.* 2006. V. 30. Pp. 478–495.

Hazel R., Prosser C. L. Molecular mechanisms of temperature Compensation in poikilotherms // *Physiol. Rev.* 1974. V. 54. No. 3. Pp. 620–634.

Heu M. S., Kim H. R., Pyeun J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1995. V. 112B. Pp. 557–567.

Heu M. S., Kim H. R., Cho D. M., Godber J. S., Pyeun J. H. Purification and characterization of cathepsin L - like enzyme from the muscle of Anchovy, *Engraulis Japonica* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1997. V.118B. No. 3. Pp. 523–529.

Hidalgo M. C., Uera E., Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities // *Aquacult.* 1999. V.170. No 3–4. Pp. 267–283.

Hiraiwa M. Cathepsin A protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein // *Cell. Mol. Life Sci.* 1999. V. 56. Pp. 894–907.

Hjelmelad K., Raa J. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*) // *Compar. Biochem. Physiol.* 1982. V.71B. No. 4. Pp. 557–562.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation to the environment // *Fish Physiology.* New York; London; Acad. Press. 1971. V. 6. Pp. 100–237.

Hochachka P. W., Somero G. N. Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia; London; Toronto: WB Saunders Company. 1973. 418 p.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution. Oxford; New York: University Press. 2002. 466 p.

Hochachka P. W., Somero G. N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University press. 2002. 466 p.

Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach (*Rutilus rutilus*) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus*). Amylase // J. Fish Biol. 1979a. V.14. Pp. 565–572.

Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach (*Rutilus rutilus*) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus*). Protease // J. Fish Biol. 1979b. V.15. Pp. 373–379.

Hofer R. Protein digestion and Proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous Cyprinid // Compar. Biochem. Physiol. 1982. V. 72A. No. 1. Pp. 55–63.

Hofer R., Schiemer F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits // Oecologia. 1981. V. 48. Pp. 342–345.

Holmgren S., Olsson C. The neuronal and endocrine regulation of gut function, in Fish Physiology, eds N. J. Bernier, G. Van Der Kraak, A. P. Farrell, and C. J. Brauner (Cambridge, MA: Academic Press), 2009. V. 28. Pp. 467–512.

Hori T., Avilez I. M., Inoue L. K., Moraes G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxa~ *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) juveniles // Comp. Biochem. Physiol. 2006. Vol. 143. No. 1. Pp. 67–72.

Hori T. S. F., Avilez I. M., Iwama G. K. et al. Impairment of the stress response in matrinxa~ juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol // Comp. Biochem. Physiology. – 2008. Vol. 147 C. Pp. 416–423.

Horn M. H., Messer K. S. Fish guts as chemical reactors: a model of the alimentary canals of marine herbivorous fishes // Mar. Biol. 1992. V. 113. Pp. 527–535.

Horn M. H., Gawlicka A. K., German D. P. Logothetis E. A., Cavanagh J. W., Boyle K. S. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory // Marine Biol. 2006 V. 149: Pp. 1237–1245.

Horsley R. W. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis // J. Fish. Biol. 1977. V. 10. Pp. 529–553.

Hoshino T., Ishizaki K., Sakamoto T., Kumeta H., Yumoto I., Matsuyama H., Ohgiya S. Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature // Lett. Appl. Microbiol. 1997. V. 25. Pp. 70–72.

Houpe K. L., Malo C., Oldham P. B., Buddington R. K. Thermal Modulation of Channel Catfish Intestinal Dimensions, BBM Fluidity, and Glucose Transport // Am. J. Physiol. 1996. V. 270. Pp. 1037–1043.

Hovda M. B., Lunestad B. T., Fontanillas R., Rosnes J. T. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of famed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Aquacult. 2007. V. 272. Pp. 581–588.

Hu K. J., Leung P. Ch. Food Digestion by Cathepsin L and Digestion-Related Rapid Cell Differentiation in Shrimp Hepatopancreas // Compar. Biochem. Physiol. 2007. V. 146 B. Pp. 69–80.

Huang G. Y., Ying G. G., Liang Y. Q., Liu Sh. Sh., Liu Y. Sh. Expression patterns of metallothionein, cytochrome P450 1A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2014. V. 105. Pp. 97–102.

Hued A. C., Oberhofer S., de los Angeles Bistoni M. 'Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes) // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2012. V. 62. Pp. 107–117.

Igbinsola E. O., Odjadjare E. E., Chigor V. N., Igbinsola I. H., Emoghene A. O., Ekhaise F. O., Igiehon N. O., Idemudia O. G. Toxicological Profile of Chlorophenols and Their Derivatives in the Environment: The Public Health Perspective // Sci. World J. Hindawi Publ. Corpor. 2013. Article ID 460215, 11. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/460215>.

Ikeda A. Embryological and histochemical studies on the development of the digestive system in a teleost *Oryzias latipes* // Hiroshima. G. Med. Sci. 1959. V. 8. Pp. 111–118.

Itoi S., Okamura T., Koyama Y., Sugita H. Chitinolytic bacteria in the intestinal tract of Japanese coastal fishes // Can. J. Microbiol. 2006. V. 52. Pp. 1158–1163.

Iwai T. Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein // Arch. Histol. Jap. 1969. V. 30. Pp. 183–189.

Izvekova G.I., Solovyev M.M., Kashinskaya E.N., Izvekov E.I. Variations in the activity of digestive enzymes along the intestine of the burbot *Lota lota* expressed by different methods // Fish Physiol. Biochem. 2013. V. 39. Iss. 5. Pp. 1181–1193.

Jamashita M., Konagaya S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta* // Comparar. Biochem. Physiol. 1990a. V. 96B. No. 2. Pp. 247–252.

Jamashita M., Konagaya S. Purification and characterization of cathepsin B from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta* // Comparar. Biochem. Physiol. 1990b. V. 96B. No. 4. Pp. 733–737.

James R., Sampath K. Effect of zeolite on the reduction of cadmium level in water and fish body and growth improvement in a catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) // Aquac. Trop. 2000. V. 15. No 4. Pp. 329–338.

Jančarik A. Über die Verdauung des Karpfens // Arch. Tierernährung. 1956. Bd 6. Ss. 1329–138.

Jančarik A. Die Verdauung der Hauptnährstoffe beim Karpfen. Z. Fischerei Hilfswiss 1964. Bd 12. Ss. 601–684.

Jankauskienė R., Lesauskienė L. Antagonistic and proteolytical activity of intestinal bacteria of the genus *Lactobacillus* in carps // Biologija (Vilnius, Lithuania). 1995. No. 1–2. Pp. 161–165.

Jany K. D. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus* Gibelio (Bloch): Endopeptidases // *Compar. Biochem. Physiol.* 1976. V. 53 B. No. 1. Pp. 31–38.

Jennings J. B. Feeding, digestion and assimilation in animals. 2nd ed. London; Basingstoke: Macmillan Press. 1972. 244 p.

Jhaveri P., Papastamatiou Y., German D. P. Digestive enzyme activities in the guts of bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*) provide insight into their digestive strategy and evidence for microbial digestion in their hindguts // *Compar. Biochem. Physiol.* 2015. V. 189A. Pp. 76–83.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S., Pokethitiyook P. 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia.* V. 28. Pp. 121–127.

Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S., Pokethitiyook P. 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* V. 18. Pp. 260–267.

Johnston P. V., Roots B. I. Brain lipids fatty acids and temperature acclimation // *Comp. Biochem. Physiol.* 1964. V. 11 B. No. 3. Pp. 303–309.

Jónás E., Rágyanszki M., Oláh J., Boross L. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes // *Aquacult.* 1983. V. 30. Pp. 145–154.

Jones D. A., Kumlu M., Le Vay L., Fletcher D. J. The Digestive Physiology of Herbivorous, Omnivorous and Carnivorous Crustacean Larvae: A Review // *Aquacult.* 1997. V. 155. Pp. 285–295.

Joyeux J.-Ch., Campanha F., Edmar A., de Coutinho Je. H. Trace metal contamination in estuarine fishes from Victoria Bay. ES. Brazil // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2004. V. 47. № 5. Pp. 765–774.

Kaláč I. Studies on herring (*Clupea harengus* L.) and capelin (*Mallotus villosus*) pyloric caeca proteases II: characterization of the anionic fractions of trypsin // *Biológia (Bratislava).* 1978. V. 33. No. 9. Pp. 701–710.

Kamunde C., Grosell M., Higgs D., Wood Ch. M. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake // *J. Exp. Biol.* 2002. V. 205. Pp. 279–290.

Kan H., Zhao F., Zhang X., Ren H., Shift S. Correlations of Gut Microbial Community Shift with Hepatic Damage and Growth Inhibition of *Carassius auratus* Induced by Pentachloroethanol Exposure // *Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 49. No. 19. Pp. 11894–11902.

Kapahi P., Chen D., Rogers A. N., Katewa S. D. With mTOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging // *Cell Metab.* 2010. V. 11. Pp. 453–465.

Kapoor B. C., Smit H., Verighina I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts // *Advances in marine biology.* New York. 1975. V. 13. Pp. 109–239.

Karasov W.H., del Rio C. M., Caviedes-Vidal E. Ecological Physiology of Diet and Digestive Systems // *Annu. Rev. Physiol.* 2011. V.73. Pp. 69–93.

Kayanja F.J., Maloiy G. M. O., Reite O. B. The fine structure of the intestinal epithelium of *Tilapia grahami* // *Anat. Anz.* 1975. V. 138. № 5. Pp. 451–462.

Kemp P., Smit M. W. Effect of Temperature Acclimatization on the Fatty Acid Composition of Goldfish Intestinal Lipids // *Biochem. J.* 1970. V. 117. Pp. 9–15.

Kim J., Burggraaf Sh. 1999. Mercury bioaccumulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the trout food web in lakes Okareka, Okaro, Taravera, Potomahana and Potorua, New Zealand // *Water Air Soil Pollut.* V. 115. Pp. 535–546.

Kim H. R., Meyers S. P., Godber J. S. Anionic trypsins from crayfish hepatopancreas: effects on protein degradation of tail meat // *J. Food Sci.* 1996. V. 61. No. 1. Pp. 78–80.

Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y., Nonami Y. Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*) // *J. Food Biochem.* 2005. V. 29. Pp. 459–469.

Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S., Ando S. Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*) // *J. Food Biochem.* 2006. V. 30. Pp. 466–477.

Kishimura H., Klomklao S., Benjakul S., Chun B. S. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) // *Food Chem.* 2008. V. 106. Pp. 194–199.

Kito H., Ose Y., Sato T., Ishika W. A. T., Nagase H. Isometallothioneins in carp (*Cyprinus carpio*) galls and spleen // *Eisei Kagaku.* 1984. V. 30. № 4. Pp. 183–188.

Knox E.G., Armstrong E., Lancashire R. et al. Heart attacks and geomagnetic activity // *Nature.* 1979. V. 281. Pp. 564–565.

Kofuji A., Akimoto H., Hosokawa H., Masumoto T. Seasonal Changes in Proteolytic Enzymes of Yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel; Carangidae) Fed Extruded Diets Containing Different Protein and Energy Levels // *Aquacult. Res.* 2005. V. 36. Pp. 696–703.

Kolkovski S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets // *Aquacult.* 2001. V. 200. Pp. 181–201.

Kolkovsky S., Tandler A., Kissil G. W., Gertler A. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae // *Fish Physiol. Biochem.* 1993. V. 12. Pp. 203–209.

Kolkovski S., Tandler A., Izquierdo M. S. Effects of live food, dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass *Dicentrarchus labrax* larvae // *Aquacult.* 1997. V. 148. Pp. 313–322.

Kolodziejaska I., Sikorski Z. E. The digestive proteases of marine fish and invertebrates // *Bull. Mor. Inst. Rybackiego, Gdynia.* 1996. V. 137. Pp. 51–56.

Kremontz A. B., Chapman G. B. Ultrastructure of the posterior half of the intestine of the Catfish, *Ictalurus punctatus* // *J. morphol.* 1975. V. 145. № 4. Pp. 441–461.

Krylov V.V., Bolotovskaya I.V., Osipova E. A. The response of European *Daphnia magna* Straus and Australian *Daphnia carinata* King to changes in geomagnetic field. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2013. V. 32. No 1. Pp. 30–39.

Kumada H., Kimura S., Yokote M. Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 1980. V. 46. Pp. 97–103.

Kumar S., Srivastava A., Chakrabarti R. Study of Digestive Proteinases and Proteinase Inhibitors of *Daphnia carinata* // *Aquacult.* 2005. V. 243 No 1–4. Pp. 367–372.

Kumar S., Garcia-Carreno F.L., Chakrabarti, R. Navarrete-del Toro M. A., Córdova-Murueta, J. H. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency // *Aquacult. Nutr.* 2007. V. 13. Pp. 381–388.

Kuperman B. I., Kuz'mina V. V. Ultrastructure of the intestinal epithelium in fishes with different type of feeding // *J. Fish Biol.* 1994. V. 44. Pp. 181–193.

Kurokawa T., Suzuki T. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody // *J. Fish Biol.* 1995. V. 46. Pp. 292–301.

Kurokawa T., Shiraishi M., Suzuki T. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae // *Aquacult.* 1998. V. 161. Pp. 491–499.

Kushmaro A. Bacterial flora in the gut of *Aplysia californica* // *Israel. J. Zool.* 1995. V. 41. N 1. Pp. 26–30.

Kuz'mina V. V. Influence of age on intestine enzyme activity in some freshwater teleosts // *Aquaculture.* 1996. V. 148. No. 1. Pp. 25–37.

Kuz'mina V. V. Classical and Modern conceptions of fish digestion. In: *Feeding and Digestive Functions in Fishes*. Ch. 4. (Eds J. E. P. Cyrino, D. Bureau, B. G. Kapoor). Enfield; NH: Science Publishers. 2008. Pp. 85–154.

Kuz'mina V. Digestion in Fish. A new view. Balti: Lambert Academic Publishing. 2017. 310 p.

Kuz'mina V. V., Gelman A. G. Membrane-Linked Digestion // *Rev. Fisher. Sci.* 1997. V. 5. No. 2. Pp. 99–129.

Kuz'mina V. V., Golovanova I. L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion // *Aquacult.* 2004. V. 234. No. 1–4. Pp. 347–360.

Kuz'mina V. V., Ushakova N. V. The Dependence on Temperature and pH of the Effects of Zinc and Copper on Proteolytic Activities of the Digestive Tract Mucosa in Piscivorous Fish and Their Potential Preys // *Fish Physiol. Biochem.* 2010. V. 36. No. 3. Pp. 787–795.

Kuz'mina V. V., Ushakova N. V. The influence of temperature and pH on the effects of zinc and copper on proteolytic activities of intestinal mucosa in planktivorous and benthophagous fishes and their potential preys // *Toxicol. Environ. Chem.* 2013. V. 95. 1. Pp. 150–162.

Kuz'mina V. V., Chuiko G. M., Pavlov D. F. Effect of DDVP, Naphtalene, and Cadmium on Intestinal Proteolytic Activity in Mozambique Tilapia (*Oreochromis*

*mis mossambicus Peters*) // Bull. Environ. Contam Toxicol. 1999. V. 62. No. 2. Pp. 193–198.

Kuz'mina V. V., Drabkin V., Gladman M., Gelman A. Amylolytic activity of fish intestinal mucosa: Temperature effects // Compar. Biochem. Physiol. 2003. V. 134B No. 3. Pp. 529–534.

Kuz'mina V. V., Golovanova I. L., Izvekova G. I. Influence of Temperature and Season On Some Characteristics of Intestinal Mucosa Carbohydrases in Six Freshwater Fishes // Compar. Biochem. Physiol. 1996. V. 113B. Pp. 255–260.

Kuz'mina V. V., Golovanova I. L., Kovalenko E. E. Separate and combined effects of cadmium, temperature and pH on digestive enzymes in threes fresh water teleosts // Env. Contam. Toxicol. 2002. V. 69. No 2. Pp. 302–308.

Kuz'mina V. V., Shalygin M. V., Skvortsova E. G. The effect of temperature on chyme proteinase activities in perch *Perca fluviatilis* L. and roach *Rutilus rutilus* (L.) // Inland Water Biol. 2012. V. 5. No. 1. Pp. 155–156.

Kuz'mina V. V., Skvortsova E. G., Zolotareva G. V., Sheptitskiy V. A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish // Fish Physiol. Biochem. 2011. V. 37. No. 3. Pp. 345–357.

Kuz'mina V. V., Skvortsova E. G., Shalygin M. V., Kovalenko K. E. Role of peptidases of the enteral microbiota and preys in temperature adaptations of the digestive system in planktivorous and benthivorous fish // Fish Physiol. Biochem. 2015. V. 41. No. 6. Pp. 1359–1368.

Kuz'mina V. V., Zolotareva G. V., Sheptitskiy V. A. Proteolytic activity in some freshwater animals and associated microbiota in a wide pH range // Fish Physiol. Biochem. 2017. V. 43. Issue 2. Pp. 373–383.

Kvåle A., Mangor-Jensen A., Moren M., Espe M., Hamre K. Development and characterisation of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae // Aquacult. 2007. V. 264. Pp. 457–468.

Lagroye I., Percherancier Y., Juutilainen J., De Gannes F. P., Veyret B., ELF magnetic fields: animal studies, mechanisms of action // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2011. V. 107. No 3. Pp. 369–373.

Lednev V. V. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems // Bioelectromagnetics. 1991. V. 12. Pp. 71–75.

Leitgeb N., Cech R., Schrottner J., Lehofner P., Schmidpeter U., Rampetsreiter M., Magnetic emissions of electric appliances // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2008. V. 211. Pp. 69–73.

Lau S., Mohamed M., Tan Chi Yen A., Su`ut S. Accumulation of heavy metals in freshwater molluscs // Sci. Total Environ. 1998. V. 214. Pp. 113–121.

Lauff M., Hofer R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes // Aquacult. V. 37. V. 4. Pp. 335–346.

Lazo J. P., Mendoza R., Holt, G. J., Aguilera C., Arnold C. R. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) // Aquacult. 2007. V. 265. Pp. 194–205.

*Le Chevalier P., Sellos D., Van Wormhoudt A.* Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from the digestive gland of the scallop *Pecten maximus* // *Compar. Biochem. Physiol.* 1995. V. 110B. Pp. 777–784.

*Lednev V. V.* Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems // *Bioelectromagnetics.* 1991. V. 12. Pp. 71–75.

*Leger Cl., Bauchart D.* Hydrolyse de triglycerides par le systeme lipasique du pancreas de Truite (*Salmo gairdneri Rich*): Mise en evidence d'un nouveau type de specificite d'action // *Compt. Rend. Hebd Seances Acad. Sci. Ser D. Sci. Nat.* // 1972. T. 275. No. 21. Pp. 2419–2422.

*Lesel R., Fromageot C., Lesel M.* Cellulose digestibility in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* and in gold fish, *Carassius auratus* // *Aquacult.* 1986. V. 54. Pp. 11–17.

*Li J., Ni J., Li J., Wang C., Li X., Wu S., Zhang T., Yu Y., Yan Q.* Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits // *J. Appl. Microbiol.* 2014. V. 117. Pp. 1750–1760.

*Liang J. Z., Rao Y. Z., Lun Z. R., Yang T. B.* Cathepsin L in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning and gene expression after a *Vibrio anguillarum* challenge // *Fish Physiol. Biochem.* 2012. V. 38. No. 6. Pp. 1795–1806.

*Liao Ch.-M., Ling M.-P., Chen J.-Sh.* Appraising zinc bioaccumulation in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and alga *Gracilaria tenuistipitata var. liui* by probabilistic analysis // *Aquaculture.* 2003. V. 217. Pp. 285–299.

*Lie O., Lambertsen G.* Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): fatty acid specificity // *Compar. Biochem. Physiol.* 1985. V. 80B. Pp. 447–450.

*Lindsay G. J. H., Gooday G. W.* Chitinolytic Enzymes and the Bacterial Microflora in the Digestive Tract of Cod, *Gadus morhua* // *J. Fish Biol.* 1985. V. 26. Pp. 255–266.

*Lindsay G. J. H., Harris J. E.* Carboxymethylcellulase activity in the digestive tracts of fish // *J. Fish Biol.* 1980. V. 16. Pp. 219–233.

*Lloret J., Shuman G., Love R. M.* Condition and health indicators of exploited marine fishes. 2014. Chichester, UK: Wiley Blackwell. 243 p.

*Louvard D., Maroux S., Desnuelle P.* Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush-border membrane. 2: Interactions of free and bound aminopeptidase with a specific antibody // *Biochim. Biophys. Acta.* 1975a. V. 389. No. 2. Pp. 389–400.

*Louvard D., Maroux S., Vannier Ch., Desnuelle P.* Topological studies on the hydrolases bound to the intestinal brush border membrane. I. Solubilization by papain and Triton X-100 // *Biochem. Biophys. Acta.* 1975b. V. 375. Pp. 236–248.

*Louvard D., Semeriva M., Maroux S.* The brush-border intestinal aminopeptidase, a transmembrane protein as probed by macromolecular photolabelling // *J. Molecular. Biol.* 1976. V. 106. Pp. 1023–1035.

*Love P. M.* 1970. Chemical biology of fishes. New York-London: Acad. Press. 547 p.

*Lubianskienė V., Jastiuginienė R.* Antibiotic and fermentative activity of bacteria found in water and digestive tract of fish from lake Drukshai at Ignalina Nuclear Power Plant // *Ekologija (Vilnius).* 1996. V. 2. Pp. 3–7.

Luczkowich J. J., Stelwag E. J. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish, *Lagodon rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance // Marine Biol. 1993. V. 116. Pp. 381–386.

Lushchak O. V., Kubrak O. I., Storey J. M., Storey K. B., Lushchak V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues // Chemosphere. 2009. V. 52. № 7. Pp. 932–937.

Ma J., Zhang D., Jiang J., Cui S., Pu H., Jiang S. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata* // Fish Shellfish Immunol. 2010. V. 29. No. 3. Pp. 501–507.

Ma J., Bu Y., Li X. Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 39. Pp. 1–8.

MacKey M. E. The digestive system in eel-pout (*Zoarces anguillaris*) // Biol. Bull. 1929. V. 56. Pp. 8–23.

MacMillan J. R., Santucci T. Seasonal trends in intestinal bacteria flora of farm-raised channel catfish // J. Aquatic. Anim. Health. 1990. V. 2. Pp. 217–222.

Marquez L., Robles R., Morales G.A., Moyano F.J. Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // Fish Physiol. Biochem. 2012. V. 38. Pp. 859–869.

Marr J. C. A., Lipton J., Cacela D., Hansen J. A., Bergman H. L., Meyer J. S., Hogstrand C. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth // Aquat. Toxicol. 1996. V. 36. No 1-2. Pp. 14–30.

Martinez A., Serra J. L. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) // Compar. Biochem. Physiol. 1989. V. 93B. Pp. 61–66.

Mason R. P., Laporte J., Andrea S. 2000. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium, and cadmium by freshwater invertebrates and fish // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 38. No 3. Pp. 283–297.

Mazon A. F., Fernandes M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (*Prochilodonidae*) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1999. V. 63. No 6. Pp. 797–804.

McLeod B. R., Smith S. D., Liboff A. R. Calcium and potassium cyclotron resonance curves and harmonics in diatoms (*A. coffeaeformis*) // J. Bioelectricity. 1987. V. 6. Pp. 153–168.

McDonald R., Schreier H. J., Watts J. E. M. Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish // PLoS ONE. 2012. V. 7. No 10. e48018. doi:10.1371/journal.pone.0048018.

Mendoza B., de la Pena S.S. Solar activity and human health at middle and low geomagnetic latitudes in Central America // Adv. Space Res. 2010. V. 46. Pp. 449–459.

Merret T. G., Bar-Eli E., Van Vunakis H. Pepsinogens A, C and D from the smooth dogfish // Biochemistry. 1969. V. 8. Pp. 3696–3702.

Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // Polish J. Environ. Stud. 2007. V. 16, No. 3. Pp. 347–362.

Mickėnienė L., Šyvokienė J. Mikrobiologiniai karpių ir jų aplinkos tyrimai // Ekologija (Vilnius). 1996. V. 1. Pp. 47–54.

Mickėnienė L., Šyvokienė J. The measurement of hydrocarbon-degrading bacteria in the digestive tract of fish as component of contaminated site assessment // Instit. Ecol. Vilnius Univer. Lithuania. 2008. URL: <http://www.sr-cosmos.gr/sr-cosmos/showpub.aspx?aa=11140>.

Mishra A., Poddar A. N. Hematological changes in the Indian Murrel (*Channa punctatus* Bloch) in response to phenolic industrial wastes of the Bhilai Steel plant (Chhattisgarh, India) // J. Res. Chem. Environ. 2011. V. 1. Iss. 2. Pp. 83–91.

Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M. D., Klionsky D. J., Ohsumi M., Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy // Nature. 1998. V. 395. Pp. 395–398.

Mizushima N., Noda T., Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway // EMBO J. 1999. V. 18. Pp. 3888–3896.

Moerland T. S. Cellulase activity in natural and temperature acclimated populations of *Fundulus heteroclitus* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1985. V. 26. Pp. 305–308.

Montgomery W. L., Pollak P. E. Gut anatomy and pH in the Red Sea surgeonfish, *Acanthurus nigrofusus* // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1988. V. 44. Pp. 7–13.

Montoya A., López-Olmeda J. F., Yúfera M., Sánchez-Muros M. J., Sánchez-Vázquez F. J. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*) // Aquacult. 2010. V. 306 Pp. 315–321.

Moore J. W., Ramamoorthy S. Organic Chemicals in Natural Waters. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer Verlag. 1984. 289 p.

Moreno N. C., Sofia S. H., Martinez C. B. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus* // Environ Toxicol Pharmacol. 2014. V. 37. Iss. 1. Pp. 448–454.

Munilla-Moran R., Saharido-Rey F. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) // Compar. Biochem. Physiol. 1996a. V. 113B. Pp. 395–402.

Munilla-Moran R., Saharido-Rey F. Digestive enzymes in marine species. 2. Amylase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), sea bream (*Sparus auratus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Compar. Biochem. Physiol. 1996b. V. 13B. No. 4. Pp. 827–834.

Munilla-Moran R., Stark J.R., Babour A. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). Aquacult. 1990. V. 88. Pp. 337–350.

Murachi T. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin // Biochem. Int. 1989. V. 18. No. 2. Pp. 263–294.

Murakami K., Noda M. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca // *Biochem. Biophys. Acta.* 1981. V. 658. Pp. 17–26.

Muto N., Ren H-W., Hwang G-S., Tominaga S., Itoh N., Tanaka K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals // *Compar. Biochem. Physiol.* 1999. V. 122 C. Is. 1. Pp. 75–82.

Nagase G. Contribution to the physiology of digestive enzymes and the effects of diets on their activity in *Tilapia mossambica* // *Z. Vergl. Physiol.* 1964. Bd 49. No. 3. Ss. 270–284.

Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. Characterization of digestive enzymes in acarnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) // *Aquacult.* 2004. V. 233. Pp. 305–320.

Navarrete del Toro M. A., García-Carreño F. L., Díaz L. M., Celis-Guerrero L., Saborowski R. Aspartic proteinases in the digestive tract of marine decapod crustaceans // *J. Exp. Zool.* 2006. V. 305A. Pp. 645–654.

Nayak S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish // *Aquaculture Res.* 2010. V. 41. Pp. 1553–1573.

Nduka J. K., Orisakwe O. E., Okerulu I. O. Heavy Metal Levels in Muscles of Some Fish Species from Aladja River; Warri, Nigeria: A Public Health Concern // *Adv. Environ. Biol.* 2010. V. 4. No 5: Pp. 125–130.

Nelson J. A., Wubah D., Whitmer M., Johnson E., Stewart D. Wood-eating cat fishes of the genus *Panaque*: gut microflora and cellulolytic enzyme activities // *J. Fish Biol.* 1999. V. 54. Pp. 1069–1082.

Nelson J. A., Dehn A. M. The GI tract in air breathing // *Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish* (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 395–434.

Nesković, N.K., Polekšec V., Elozović I., Karan V., Budimir M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996. V. 56. Pp. 295–302.

Nikolopoulou D., Moutou K.A., Foutoulaki E., Venon B., Adamidou S., Alexis M.N. Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) // *Compar. Biochem. Physiol.* 2011. V. 158A. Pp. 406–414.

Niederholzer R., Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach *Rutilus rutilus* L. and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. Cellulase // *J. Fish Biol.* 1979. V. 15. No 4. Pp. 411–416.

Nishi Y., Takesue Y. F. Electron microscop studies on Triton-solubilized sucrose from rabbit small intestine // *J. Ultrastruct. Res.* 1978. V. 62. Pp. 1–12.

Noaillac-Depeyre J., Gas N. Mise en évidence d'une zone adaptée au transport des ions dans l'intestin de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) // *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, 1973. V. 276. Pp. 773–776.

Noaillac-Depeyre J., Gas N. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.) // Cell. Tissue Res. 1974. V. 155. № 3. Pp. 353–365.

Noaillac-Noaillac-Depeyre J., Gas N. Ultrastructural and cytochemical study of the gastric epithelium in a freshwater teleostean fish *Perca fluviatilis* // Tiss. Cell. 1978. V. 10. № 1. Pp. 23–37.

Noaillac-Depeyre J., Gas N. Structure and function of the intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatilis* L.) // Anat. Rec. 1979. V. 195. No. 4. Pp. 773–776.

Nunes A. L., Katsanevakis S., Zenetos A., Cardoso A. C. Gateways to alien invasions in the European seas // Aquat. Invasions. 2014. V. 9. No. 2. Pp. 133–144.

Odense P. H., Bishop C. M. The ultrastructure of the epithelial border of the ileum, pyloric caeca, and rectum of the cod, *Gadus morhua* // J. Fish. Res. Bd Can. 1966. V. 23. Pp. 1841–1843.

Ogbondeminu F. S. The occurrence and distribution of enteric bacteria in fish and water of tropical aquaculture ponds in Nigeria // J. Aquacult. Trop. 1993. V. 8. Pp. 61–66.

Oh E. S., Kim D. S., Kim J. H., Kim H. R. Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis* // J. Food Biochem. 2000. V. 24. Pp. 251–264.

Ogino C., Yang G.-Y. Requirement of rainbow trout for dietary zinc // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1978. V. 44. Pp. 1015–1018.

Ojeda F. P., Caceres C. W. Digestive mechanisms in *Aplodactylus punctatus* (Valenciennes): a temperate marine herbivorous fish // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1. 1995. V. 118. Pp. 37–42.

Okada S., Aikawa T. Cathepsin D-like acid proteinase in the mantle of the marine mussels, *Mytilus edulis* // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 84B. Pp. 333–341.

Olafsen J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture // Aquacult. 2001. V. 200. Pp. 223–247.

Olsson C. The enteric nervous system // Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish (Eds M. Grosell, A.P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 320–350.

Oozeki Y., Bailey K. M. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma* // Mar. Biol. Berlin; Heidelberg. 1995. V. 122. No. 2. Pp. 177–186.

Otsuka K., Cornelissen G., Weydahl A., Holmeslet B., Hall C. Geomagnetic disturbance associated with decrease in heart rate variability in a subarctic area // Biomed. Pharmacother. 2001. V. 55. Suppl. 1. Pp. 51–56.

Outzen H., Berglund G. I., Smalas A. O., Willassen N. P. Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin // Compar. Biochem. Physiol. 1996. V. 115B. N 1. Pp. 33–45.

Overnell J. Digestive enzymes of the pyloric ceca and of their associated mesentery in the cod (*Gadus morrhua*) // Compar. Biochem. Physiol. 1973. V. 46. Pp. 519–531.

Page J. W., Andrewest J. W., Murai T., Murra, M. W. Hydrogen ion concentration in the gastrointestinal tract of channel catfish // J. Fish Biol., 1976. Vol. 8. Pp. 225–228.

Papastamatiou Y. P., Lowe C. G. Postprandial response of gastric pH in leopard sharks (*Triakis semifasciata*) and its use to study foraging ecology // J. Exp. Biol. 2004. V. 207. No. 2. Pp. 225–232.

Papastamatiou Y. P., Lowe C. G. Variations in gastric acid secretion during fasting between two species of shark // Comp. Biochem. Physiol. 2005. V. 141 A. Pp. 210–214.

Papastamatiou Y. P., Purkis S. J., Holland K. N. The response of gastric pH and motility to fasting and feeding in free swimming blacktip reef sharks, *Carcharhinus melanopterus* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2007. V. 345. Pp. 129–140.

Parra A. M., Rosas A., Lazo J. P., Viana M. T. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions // Fish Physiol. Biochem. 2007. V. 33. Pp. 223–231.

Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Scombridae) // J. Food Biochem. 1997a. V. 21. Pp. 383–400.

Pavlisko A., Rial A., de Vecchi S., Coppes Z. Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* “Palometa” // J. Food Biochem. 1997b. V. 21. Pp. 289–308.

Pavlisko A., Rial A., Coppes Z. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortia spp.*) and mullet (*Mugil spp.*) from the southwest Atlantic region // J. Food Biochem. 1999. V. 23. Pp. 225–241.

Pavlov D. S., Kasumyan A. O. Feeding diversity in fishes: trophic classification of fish // J. of Ichthyology. 2002. V. 42. Suppl. 2. Behavior, distribution and migration of fishes. Pp. 137–159.

Peaucellier G. Purification and Characterization of Proteinases from the Polychaete Annelid *Sabellaria alveolata* (L.) // Eur. J. Biochem. 1983. V. 136. Pp. 435–445.

Pedersen B. H., Andersen K. P. Induction of trypsinogen secretion in herring larvae (*Clupea harengus*) // Marine Biology. 1992. V. 112. Pp. 559–565.

Pedersen B. H., Hjelmeland K. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods // Marine Biology. 1988. V. 97. Pp. 467–476.

Penry D. L., Jumars P. Modeling animal guts as chemical reactors // Americ. Natur. 1987. V. 129. No. 1. Pp. 69–96.

Peixoto F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation // Chemosphere. 2005. V. 61. N 8. Pp. 1115–1122.

Perrot V., Pastukhov M., Epov V., Soren S., Donard O., Amouroux D. Higher Mass-Independent Isotope Fractionation of Methylmercury in the Pelagic Food Web of Lake Baikal (Russia). Environ. Sci. Technol. 2012. V. 46. Pp. 5902–5911.

Persinger M. A., McKay B. E., O’Donovan C. A., Koren S. A. Sudden death in epileptic rats exposed to nocturnal magnetic fields that simulate the shape and

the intensity of sudden changes in geomagnetic activity: an experiment in response to Schnabel, Beblo and May // *Int. J. Biometeorol.* 2005. V. 49. Pp. 256–261.

*Pierce R. C., Spear P. A.* Copper in the aquatic environment: chemistry, distribution and toxicology // *Nat. Res. Coun. Can.* 1979. V. NRCC. No 16454. 227 p.

*Poddubny A.G., Galat D.L.* 1995. Habitat associations of upper Volga river fishes: effects of reservoirs // *Regulated rivers: reseach and management.* V. 11. Pp. 67–84.

*Porcellia M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De Rosa M., Zappia V.* Non-thermal effects microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system // *FEBS Lett.* 1997. V. 402. No. 2–3. Pp. 102–106.

*Pourang N., Dennis J. H., Ghourchian H.* Tissue Distribution and Redistribution of Trace Elements in Shrimp Species with the Emphasis on the Roles of Metallothionein. *Ecotoxicol.* 2004. V. 13. Pp. 519–533.

*Prakash L.* Distribution and differentiation of alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of steelhead trout // *J. Exp. Zool.* 1961. V. 146. Pp. 237–251.

*Prejs A., Blaszczyk M.* Relationships between food and cellulase activity in freshwater fishes // *J. Fish Biol.* 1977. V. 11. Pp. 447–452.

*Purkerson M. L., Jarvis J. U. M., Luse S. A., Dempsey E. W.* Electron microscopy of the intestine of the African lungfish, *Protopterus aethiopicus* // *Anat. Rec.* 1975. V. 182. No 1. Pp. 71–89.

*Pyle G. G., Kamunde C. N., McDonald D. G., Wood C. M.* Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *J. Exp. Biol.* 2003. V. 206. No 3. Pp. 609–618.

*Raae A. J., Walther B. T.* Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase from cod (*Gadus morhua L.*) // *Compar. Biochem. Physiol.* 1989. V. 93B. Pp. 317–324.

*Raae A. J., Flengsrud R., Sletten K.* Chymotrypsin Isoenzymes in Atlantic Cod: Differences in Kinetic and Substrate Specificity // *Compar. Biochem. Physiol.* 1995. V. 112B. Pp. 393–398.

*Raksakulthai N., Haard N. F.* Fish sauce from capelin (*Mallotus villosus*): Contribution of cathepsin C to the fermentation // *Ocean Food J. Kuala Lumpur* // 1992. V. 7. No. 3. Pp. 147–151.

*Ramírez-Duarte W. F., Rondón-Barragán I. S., Eslava-Mocha P. R.* Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*) // *Pesq. Vet. Bras.* 2008. V. 28. N 11. Pp. 547–554.

*Ray A. K., Roy T., Mondal S., Ringo E.* Identification of gut associated amylase, cellulase and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps // *Aquacult. Res.* 2010. V. 41. Pp. 1462–1469.

*Ray A. K., Ghosh K., Ringø E.* Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review // *Aquacult. Nutr.* 2012. V. 18. No. 5. Pp. 465–492.

*Reid R. G. B., Rauchert K.* Protein Digestion in Members of the Genus *Macoma* (Mollusca: Bivalvia) // *Compar. Biochem. Physiol.* 1972. V. 41 A. Pp. 887–895.

Reid R. G. B., Rauchert K. Protein digestion in members of the genus *Macoma* (mollusca: bivalvia) // Compar. Biochem. Physiol. 1972. V. 41A. Pp. 887–895.

Reid R. G. B., Rauchert K. Cathaptic Endopeptidases and Protein Digestion in the Horse Clam *Tresus capax* (Gould) // Comp. Biochem. Physiol. 1976. V. 54 B. Pp. 467–472.

Ribeiro L., Zambonino-Infante J. L., Cahu C., Dinis M. T. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet // Fish Physiol. Biochem. 2002. V. 27. Pp. 61–69.

Ringo E., Birkbeck T. H. Intestinal microflora of fish and fry: a review // Aquatic. Res. 1999. V. 30. No. 2. Pp. 73–93.

Roch M., McCarter J. A. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held in a series of contaminated lakes // Compar. Biochem. Physiol. 1984. V. 77C. No 1. Pp. 77–82.

Rochalska M., Grabowska K. Influence of magnetic fields on the activity of enzymes:  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants // Int. Agrophys. 2007. V. 21. Pp. 185–188.

Roche H., Boge G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*) // Compar. Biochem. Physiol. 2000. V. 125C. Pp. 345–353.

Romero J., Navarrete P. 16S rDNA-Based Analysis of Dominant Bacterial Populations Associated with Early Life Stages of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) // J. Microbiol. Ecol. 2006. V. 51. Pp. 422–430.

Rønnestad I., Yúfera M., Ueberschär B., Ribeiro L., Sæle Ø., Boglione C. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research // Rev. Aquacul. 2013. V. 5. Pp. S59–S98.

Ruzic R., Jerman I. Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  in biological effects of direct and indirect elf magnetic field stimulation // Electromagn. Biol. Med. 1998. V. 17. Pp. 205–216.

Rzymiski P., Klimaszuk P., Kubacki T., Poniedziałek B. The effect of glyphosate-based herbicide on aquatic organisms – a case study // Limnol. Rev. 2013. V. 13. N 4. Pp. 215–220.

Rashed M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake // Environ. Internat. 2001. V. 27. Pp. 27–33.

Sabapathy U., Teo L. H. Some properties of the intestinal proteases of the rabbit fish, *Siganus canaliculatus* (Park). Fish Physiol. Biochem. 1995. V. 14. No. 3. Pp. 215–221.

Sakai J., Sakaguchi Y., Matsumoto J. J. Acid proteinase activity of squid mantle muscle: some properties // Comp. Biochem. Physiol. 1981. V. 70B. Pp. 791–794.

Salbego J., Preto A., da Silva V. M. M., Loro V. L., Lazzari R., Gioda C. R., Baldisserotto B. Glyphosate on digestive enzymes activity in piava (*Leporinus obtusidens*) // Ciência Rural. 2014. V. 44. N 9. Pp. 1603–1607.

Sandheinrich M. B., Atchison G. J. Sublethal copper effects of on bluegill, *Lepomis macrochirus*, foraging behaviour // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1989. V. 46. Pp. 1977–1985.

*Sarbahi D. S.* Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish and largemouth black bass // *Biol. Bull.* 1951. V. 100. N. 2. Pp. 244–257.

*Sastry K. V., Gupta P. K.* The effect of cadmium on the digestive system of the teleost fish, *Heteropneustes fossilis* // *Environ. Res.* 1979. V. 19. Pp. 221–230.

*Sastry K. V., Subhadra K.* *In vivo* effect of cadmium on some enzyme activities in tissue of the fresh water catfish *Heteropneustes fossilis* // *Environ. Res.* 1985. V. 35. Pp. 32–45.

*Sauer G. R., Watabe N.* Ultrastructural and histochemical aspects of zinc accumulation by fish scales // *Tissue Cell.* 1989. V. 21. № 6. Pp. 935–944.

*Sciara K. L., Isley J., Tomasso J. R., Klaine S. J.* Influence of multiple water-quality characteristics on copper toxicity to fathead minnows (*Pimephales promelas*) // *Environ. Toxicol. Chem.* 2004. V. 23. № 12. Pp. 2900–2905.

*Seth H., Axelsson M., Farrell A. P.* The circulation and metabolism of gastrointestinal tract // *Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish* (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 351–394.

*Shintani T., Mizushima N., Ogawa Y., Matsuura A., Noda T., Ohsumi Y.* Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast // *EMBO J.* 1999. V. 18. Pp. 5234–5241.

*Shulman G. E., Love R. M.* The biochemical ecology of marine fishes // *Advances in Marine Biology.* San Diego: Acad. Press. 1999. V. 36. 351 p.

*Siringana P., Raksakulthai N., Yongsawatdigul J.* Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) // *Food Chem.* 2006. V. 98. Pp. 678–684.

*Siringana P., Raksakulthai N., Yongsawatdigul J.* Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) // *Food Chemistry.* 2007. V. 101. Pp. 82–89.

*Simkiss K., Taylor M. G.* Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms // *Rev. Aquat. Sci.* 1989. V. 1. Pp. 173–188.

*Skrodenytė-Arbačiaskienė V.* Proteolytic activity of the roach (*Rutilus rutilus*) intestinal microflora // *Acta Zool. Lit.* 2000. V. 10. Pp. 69–77.

*Smit H.* Gastric secretion in the lower vertebrates and birds. In: *Handbook of Physiology.* Sec. 6. Alimentary canal (Ed. C.F. Code). Washington: Am. Physiol. Soc. V. 5. 1968. Pp. 2791–2805.

*Smith E. A., Oehme F. W.* The biological activity of glyphosate to plants and animals: A literature review // *Vet. Hum. Toxicology.* 1992. V. 34. N 6. Pp. 531–543.

*Smith F. A., Sharma R. P., Low J. B.* 1974. Mercury and selected pesticide levels in fish and wild life of Utah: levels of mercury in fish // *Bull. Environ. Toxicol.* V. 12. No 1. Pp. 153–157.

*Solovyev M. M., Izvekova G. I., Kashinskaya E. N., Gisbert E.* Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors // *Hydrobiologia.* 2017. DOI 10.1007/s10750-017-3383-0

Somero G. N., Lockwood B. J., Tomanek L. Biochemical adaptation: Response to Environmental Challenges from Life's Origins to the Anthropocene. New York: Oxford University press. 2017. 572 p.

Spallanzani L. Experiences sur la digestion de l'homme et de differentes especes d'animaux. Geneve. 1783. 298 p.

Spear P. A. Zinc in the aquatic environment: chemistry, distribution, and toxicology // National Research Council of Canada Publication 1981. NRCC 17589. 145 p.

Spry D. J., Wood C. M. The influence of dietary and waterborne zinc on heat-stable metal ligands in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: Quantification by cadmium-109 radioassay and evaluation of the assay // J. Fish Biol. 1989. V. 35. № 4. Pp. 557–576.

Srivastava A. S., Kurokawa T., Suzuki T. Molecular cloning and cDNA sequence analysis of carboxypeptidases A1, A2 and B from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* // Compar. Biochem. Physiol. 2003. V. 135B. Pp. 593–599.

Stanley K. I., Luzio J. P. The Arrhenius plot behavior of rat liver 5'-nucleotidase in different lipid environments // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 514. No. 1. Pp. 198–205.

Stickney R. R., Shumway S. Occurrence of Cellulase Activity in the Stomach of Fishes // Fish Biol. 1974 V. 6. Pp. 779–790.

Stoilova I., Dimitrova S. Geophysical variables and human health and behavior // J. Atmos. Solar Terr. Phys. 2008. V. 70. Pp. 428–435.

Straus D. L. The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond water // Aquaculture. 2003. V. 219. No 1–4. Pp. 233–240.

Stroband H. W. J. Growth and diet dependent structural adaptations of the digestive tract in juvenile grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*, Val.) // J. Fish. Biol. 1977. V. 11. № 2. Pp. 167–174.

Sugita H., Ishida Y., Deguchi Y., Kadota H. Bacterial flora in the gastrointestinal tract of *Tilapia nilotica* adapted in seawater // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1982. V. 48 No. 7. Pp. 987–991.

Sugita H., Ito Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin // Lett Appl Microbiol. 2006. V. 43. No. 3. Pp. 336–342.

Sugita H., Iwata J., Miyajima C., Kubo T., Noguchi T., Hashimoto K., Deguchi Y. Changes in microflora of a puffer fish *Fugu niphobles*, with different water temperatures // Mar. Biol. 1989. V. 101. No. 3. Pp. 299–304.

Sugita H., Kawasaki J., Deguchi Y. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish // Lett. Appl. Microbiol. 1997. V. 24. No. 2. Pp. 105–108.

Sun L.-T., Jeng S.-S. Accumulation of zinc from diet and its release in common carp // Fish Physiol. Biochem. 1999. V. 20. Pp. 313–324.

Sunde J., Eiane S. A., Rustad A., Jensen H. B., Opstvedt J., Nygård E., Venturini G., Rungruangsak-Torrissen K. Effect of fish feed processing conditions on diges-

tive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) // *Aquacul. Nutr.* 2004. V. 10. Pp. 261–277.

*Sushchik N. N., Gladyshev M. I., Kalachova G. S., Kravchuk E. S., Dubovskaya O. P., Ivanova E. A.* Particulate fatty acids in two small Siberian reservoirs dominated by different groups of phytoplankton // *Freshwater Biology.* 2003a. V. 48. Pp. 394–403.

*Sushchik N. N., Gladyshev M. I., Moskvichova A. V., Makhutova O. N., Kalachova G. S.* Comparison of fatty acid composition in major lipid classes of the dominant benthic invertebrates of the Yenisei river // *Compar. Biochem. Physiol.* 2003b. V. 134B. Pp. 111–122.

*Suzer C., Firat K., Saka S.* Ontogenic Development of the Digestion Enzymes in Common Pandora, *Pagellus erythrinus* L. Larvae // *Aquacult. Res.* 2006. V. 37. Pp. 1565–1571.

*Syvanen M.* Cross-species gene transfer; implications for a new theory of evolution // *J. Theoret. Biol.* 1985. V. 112. No. 2. Pp. 333–343.

*Šyvokienė J., Mickėnienė L., Milerienė E., Repechka R., Vaitonis G.* Microflora of digestive tract of Kaunas reservoir hydrobionts // *Ekologija* (Vilnius) 1996. V. 1. Pp. 29–34.

*Šyvokienė J., Mickėnienė L., Kazlauskienė N., Stasiūnaitė Pp.* Macro- in mikroorganizmu tarpusavio santykiu įvertinimas lašišinėse žuvyse imant pavyzdžiu šlakį // *Ekologija.* 1997. No. 4. Pp. 40–48.

*Szarek J., Siwicki A. K., Andrzejewska A., Przewdzieka D., Fabezak J., Terlech-Majewska E., Banaszewich T.* Effect of the herbicide Roundup™ on ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*) // *Mar. Environ. Res.* 2000. V. 50. Pp. 263–266.

*Takei Y., Loretz Ch. A.* The gastrointestinal tract as an endocrine/neuroendocrine/paracrine organ: organization, chemical messengers and physiological targets // *Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish* (Eds M. Grosell, A.P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 262–321.

*Taylor J. R., Cooper C. A., Mommsen T. A.* Implications of GI function for gas exchange, acid-base balance and nitrogen metabolism // *Fish physiology. The Multifunctional Gut of Fish* (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 214–261.

*Teschke M., Saborowski R.* Cysteine proteinases substitute for serine proteinases in the midgut glands of Crangon crangon and Crangon allmani (Decapoda: Caridea). // *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 2005. V. 316. Pp. 213–229.

*Thompson E. D., Mayer G. D., Walsh P. J. and Hogstrand C.* Sexual maturation and reproductive zinc physiology in the female squirrelfish // *J. Exper. Biol.* 2002. V. 205. Pp. 3367–3376.

*Torrissen K. R.* Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Compar. Biochem. Physiol.* 1984. V. 77 B. Pp. 669–674.

Track N. S. Evolutionary aspects of the gastrointestinal hormones // *Compar. Biochem. Physiol.* 1973. V. 45B. Pp. 291–301.

Trust T. J., Sparrow R. A. H. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes // *Can. J. Microbiol.* 1974. V. 20. Pp. 1219–1228.

Trust T. J., Bull L. M., Currie B. R., Buckley J. T. Obligate Anaerobic Bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharingodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *J. Fish. Res. Bd. Can.* 1979. V. 36. No. 10. Pp. 1174–1179.

Tulonen T., Pihlström M., Arvola R., Rast M. Concentration of heavy metals in food web components of small, boreal lakes // *Boreal Envir. Res.* 2006. V. 11. № 3. Pp. 185–194.

Twining S. S., Alexander P. A., Huibregtsem K., Glick D. M. A pepsinogen from rainbow trout // *Compar. Biochem. Physiol.* 1983. V. 75B. Pp. 109–112.

Ugolev A. M., Kuz'mina V. V. Membrane hydrolases of fish enterocytes. Temperature adaptation // *Compar. Biochem. Physiol.* 1993. V. 106B. No. 2. Pp. 443–452.

Ugolev A. M., Kuz'mina V. V. Fish Enterocyte Hydrolases. Nutrition Adaptation // *Compar. Biochem. Physiol.* 1994. V. 107A. Pp. 187–193.

Ugolev A. M., Egorova V. V., Kuz'mina V. V., Gruzdkov A. A. Comparative-molecular characterization of membrane digestion in fish and mammals // *Compar. Biochem. Physiol. (England)*. 1983. V. 76. No 3. P. 627–635.

Ullrich S. M., Tanton T. W., Abdrashitova S. A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation // *Environ. Sci. Technol.* 2001. V. 31. No. 3. Pp. 241–293.

Ushakov B. P. Thermostability of cells and proteins in poikilotherms // *Physiol. Rev.* 1964. V. 44. Pp. 518–560.

Uys W., Hecht T. 1987. Assays on the digestive enzymes of sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Claridae) // *Aquaculture*. 1987. V. 63. Pp. 301–313.

Valee B. L., Ulmer D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead // *Annu. Rev. Biochem.* 1972. V. 41. Pp. 91–128.

Van Campenhout K., Bervoets L., Blust R. Assimilation efficiencies of Cd and Zn in the common carp (*Cyprinus carpio*): Effects of metal concentration, temperature and prey type // *Environ. Polut.* 2007. V. 145. Pp. 905–914.

Vonk H. J. The specificity and collaboration of digestive enzymes in Metazoa // *Biol. Rev.* 1937. V. 12. Pp. 245–284.

Vega-Villasante F., Nolasco H., Civera R. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* – II. Properties of protease activity in whole digestive tract // *Compar. Biochem. Physiol.* 1995. V. 112B. Pp. 123–129

Vergani L., Lanza C., Scarabelli L., Canesi L., Gallo G. Heavy metal and growth hormone pathways in metallothionein regulation in fish RTH-149 cell line // *Compar. Biochem. Physiol.* 2009. V. 149C. Pp. 572–580.

Verma S., Dixit R., Panday K. C. Cystein Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets // *Frontiers Pharmacol.* 2016. URL: <http://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>.

Versteeg D. J., Guesy J. P. Lysosomal enzyme release in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) exposed to cadmium // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1985. V. 14. Pp. 631–640.

Visessanguan W., Menino A. R., Kim S. M., An H. Cathepsin L: A predominant heat activated proteinase in arrowtooth flounder muscle // J. Agr. Food. Chem. 2001. V. 49. No. 5. Pp. 2633–2640.

Visessanguan W., Benjakul S., An H. Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) muscle // Compar. Physiol. Biochem. 2003. V. 134B. No. 3. Pp. 474–487.

Vonk H. J. The specificity and collaboration of digestive enzymes in Metazoa // Biol. Rev. 1937. V. 12. Pp. 245–284.

Vonk H. J., Western J. R. H. Invertebrate Proteinases. In: Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion (Eds H. J. Vonk, J. R. H. Western). London: Acad. Press. 1984. Pp. 184–254.

Voveriene G. 2002. Hydrocarbon – Degrading bacteria in the digestive tract of fish. Summary of Doctoral Dissertation Biomed. Sci. Inst. Ecology. Vilnius. Lithuania. 54 p.

Wang B., Wang C., Mims S. D., Xiong Y. L. Characterization of the proteases involved in hydrolyzing paddlefish (*Polyodon spathula*) myosin // J. Food Biochem. 2000. V. 24. Pp. 503–515.

Watanabe T., Viron V., Satoh S. Trace minerals in fish nutrition // Aquacult. 1997. V. 151. Pp. 185–207.

Webster T. M. U., Santos E. M. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup // BMC Genomics. 2015. V. 16. Pp. 32–46.

Wiener J. G. Mercury exposed: Advances in environmental analysis and ecotoxicology of a highly toxic metal // Environ. Toxicol. Chem. 2013. V. 32. No. 10. Pp. 2175–2178.

Weinstein B. A general homology correlation for various hormones and proteins // Experientia. 1972. V. 28. Pp. 1517–1522.

Weis J. S., Khan A. A. Effects of mercury on the feeding behavior of the mummichog, *Fundulus heterolitus* from a polluted habitat // Mar. Environ. Res. 1990. V. 30. № 4. Pp. 243–249.

Western J. R. H., Jennings J. B. Histochemical demonstration of hydrochloric acid in the gastric tubules of teleosts using an *in vivo* Prussian blue technique // Compar. Biochem. Physiol. 1970. V. 35. No. 4. Pp. 879–884.

Williams G. M., Kroes R., Munro I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2000. V. 31. Pp. 117–165.

Wilson J. M., Castro L. F. C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes // The Multifunctional Gut of Fish (Eds M. Grosell, A. P. Farrell, C. J. Brauner). Amsterdam, Boston: Academic Press. 2011. V. 30. Pp. 57–110.

Wyban J. A. Soluble Peptidase Isozymes of the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*): Tissue Distributions and Substrate Specificities // Biochem. Genet. 1982. V. 20. No. 9–10. Pp. 849–858.

Yamamoto T. An election microscopic study of the columnar epithelial cell in the intestine of fresh water teleosts: goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo irideus*) // Z. Zeilforsch. Mikroskop. 1966. V. 72. Pp. 66–87.

Yamane S. Localization of amylase activity in digestive organs of carp determined by a substrate film method // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1973. V. 39. No 5. Pp. 47–52.

Yamashita M., Kanagaya S. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1990a. V. 56. No. 8. Pp. 1271–1277.

Yamashita M., Kanagaya S. Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum Salmon, *Oncorhynchus keta* // Compar. Biochem. Physiol. 1990b. V. 96B. No. 2. Pp. 247–253.

Yoshinaka R., Sato M., Suzuki T., Ikeda S. Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish (*Parasirulus asotus*) // Compar. Biochem. Physiol. 1984. V. 77B. No. 1. Pp. 1–6.

Yoshitomi B. Seasonal variation of crude digestive protease activity in Antarctic krill *Euphausia superba* // Fisheries Sci. 2005. V. 71. Pp. 12–19.

Yufera M., Fernandez-Diaz C., Vidaurreta A., Cara J. B., Moyano F. J. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Mar. Biol.* 2004. V. 144. Pp. 863–869.

Yufera M., Moyano F. J., Astola A., Pousao-Ferreira P., Martinez-Rodriguez G. Acidic digestion in a teleost: Postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression // PLoS ONE. 2012. V. 7. No. 3. Pp. e33687.

Zhao W., Chen L., Zhang F., Wu P., Li E., Qin J. Molecular characterization of cathepsin L cDNA and its expression during oogenesis and embryogenesis in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Palaemonidae) // Genet. Mol. Res. 2013. V. 12. No. 4. Pp. 5215–5225.

Zhao Y., Lu Ji., Wu Y., Song X., Wang F., Liu Ch., Xing D., Liu Ji. Influence of total organic carbon in sea water on accumulation of copper, lead and cadmium by tissues of Asian paralichth, *Paralichthys olivaceus* // Trans. Chin. Soc. Agr. Eng. 2004. V. 20. No 3. Pp. 234–238.

Zhu B. W., Zhao L. L., Sun L. M., Li D. M., Murata Y., Yu L., Zhang L. Purification and characterization of a cathepsin L-like enzyme from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. V. 72. No. 6. Pp. 1430–1437.

Zhou Zh., Liu Y., Shi P., He S., Yao B., Ringø E. Molecular characterization of the autochthonous microbiota in the gastrointestinal tract of adult yellow grouper (*Epinephelus awoara*) cultured in cages // Aquacult. 2009. V. 286. Pp. 184–189.

## Оглавление

Предисловие .....	5
<i>Глава 1. Механизмы пищеварения. Дискуссионные вопросы</i> .....	8
1.1. Структурная организация пищеварительной системы рыб .....	8
1.2. Внеклеточное или полостное пищеварение .....	12
1.3. Внутриклеточное пищеварение .....	14
1.4. Мембранное пищеварение .....	15
1.5. Симбионтное пищеварение .....	25
1.6. Индуцированный аутолиз .....	33
1.7. Взаимодействие различных типов пищеварения .....	40
1.8. Заключительные замечания .....	46
<i>Глава 2. Активность одноименных ферментов пищеварительного тракта консументов, их потенциальных объектов питания, энтеральной и ассоциированной микрофлоры</i> ....	50
2.1. Соотношение активности одноименных ферментов пищеварительного тракта консументов и их потенциальных объектов питания .....	51
2.2. Ферменты, обеспечивающие индуцированный аутолиз и симбионтное пищеварение .....	57
2.3. Нутритивные адаптации пищеварительной системы рыб .....	59
2.4. Заключительные замечания .....	65
<i>Глава 3. Влияние температуры на активность и характеристики пищеварительных ферментов рыб, их потенциальных объектов питания, энтеральной и ассоциированной микрофлоры</i> .....	69
3.1. Влияние сезона на активность пищеварительных ферментов рыб .....	70
3.2. Особенности влияния температуры на активность ферментов слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофлоры у разных видов рыб .....	74
3.2.1. Влияние температуры на активность и характеристики ферментов слизистой оболочки рыб .....	75
3.2.2. Влияние температуры на активность и характеристики ферментов потенциальных объектов питания рыб .....	82

3.3. Сравнение влияния температуры на активность ферментов слизистой оболочки кишечника, химуса и кишечной микрофлоры у разных видов рыб .....	97
3.3.1. Влияние температуры на активность казеин- и гемоглоблилитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты рыб в летний период .....	98
3.3.2. Влияние температуры на активность казеин- и гемоглоблилитических пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у ихтиофагов в зимний период .....	100
3.4. Влияние температуры на кинетические характеристики ферментов .....	103
3.5. Заключительные замечания .....	110
<i>Глава 4. Влияние рН на активность пищеварительных гидролаз рыб .....</i>	<i>114</i>
4.1. Значения рН слизистой оболочки и содержимого пищеварительного тракта рыб .....	114
4.2. Влияние рН на активность ферментов слизистой оболочки, содержимого пищеварительного тракта, энтеральной и ассоциированной микробиоты рыб .....	116
4.3. Влияние особенностей водоема на рН зависимость пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса, кишечной и ассоциированной микробиоты .....	120
4.3.1. Влияние рН на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты у рыб из разных водохранилищ .....	121
4.3.2. Влияние условий среды обитания на рН зависимость пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты рыб из экосистемы р. Днестр .....	129
4.3.3. Влияние условий биотопа на рН зависимость пептидаз слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты рыб из Рыбинского водохранилища .....	132
4.4. Влияние рН на активность ферментов потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты .....	137

4.4.1. Влияние рН на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты ...	138
4.4.2. Влияние рН на активность гликозидаз потенциальных объектов питания рыб и ассоциированной микробиоты ....	141
4.5. Сочетанное влияние температуры и рН на активность пищеварительных ферментов рыб и их объектов питания .....	144
4.6. Заключительные замечания .....	147
<i>Глава 5. Влияние антропогенных факторов на активность и некоторые характеристики пищеварительных ферментов .....</i>	<i>151</i>
5.1. Краткая характеристика металлов, концентрация в воде и пище, пути поступления и влияние на организм рыб .....	151
5.2. Влияние металлов на активность и характеристики пищеварительных ферментов рыб .....	165
5.3. Влияние токсических веществ органической природы на активность и характеристики пищеварительных ферментов .....	183
5.4. Влияние магнитных полей и геомагнитных бурь на активность пептидаз и гликозидаз слизистой оболочки рыб .....	194
5.5. Заключительные замечания .....	208
<i>Глава 6. Роль мультифункциональности пищеварительного тракта, полипотентности ферментов рыб и их адаптаций в функционировании водных экосистем .....</i>	<i>214</i>
6.1. Роль полифункциональности пищеварительного тракта рыб ..	215
6.2. Роль полипотентности пищеварительных ферментов рыб ....	217
6.3. Классификация и роль адаптаций в функционировании пищеварительной системы .....	226
6.4. Заключительные замечания .....	234
Заключение .....	238
Литература .....	244

Научное издание

**Кузьмина Виктория Вадимовна**

**ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ  
НОВЫЕ ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ**

Оригинал-макет подготовлен  
издательским бюро «Филигрань».

Подписано в печать .11.18. Формат 60х90 1/16.  
Усл. печ. л. 18,75. Заказ № 18192. Тираж 150 экз.

Отпечатано в типографии ООО «Филигрань»  
г. Ярославль, ул. Свободы, д. 91  
pechataet.ru