



**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

ТОМ I

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ
И БИОХИМИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
The Program "Biological resource of Russia" 2009-2011
Institute of Biology Karelian Research Centre of RAS

**CURRENT PROBLEMS
OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY
OF AQUATIC ORGANISMS**

VOLUME I

**ECOLOGICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY
OF AQUATIC ORGANISMS**

Collected Scientific Papers

Petrozavodsk

2010

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Отделение биологических наук РАН
Программа фундаментальных исследований на 2009-2011 гг.:
«Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга»
Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

ТОМ I

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Сборник научных статей

Петрозаводск

2010

УДК 574.522
ББК 28.67
С 56

С 56 **СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ.** Том I. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. сборник научных статей – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. – 320 с.
ISBN 978-59274-0438-4

УДК 574.522
ББК 28.67

Редколлегия сборника:

Чл.-корр. РАН Н.Н. Немова (ИБ КарНЦ РАН)
Д.б.н., профессор Г.М. Чуйко (ИБВВ РАН)
К.б.н. О.В. Мещерякова (ИБ КарНЦ РАН)
К.б.н. С.А. Мурзина (ИБ КарНЦ РАН)

Сборник издан при поддержке:

Отделения биологических наук РАН

Программы фундаментальных исследований на 2009–2011 гг.

«Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга»

© Коллектив авторов, 2010

© ИБ КарНЦ РАН, 2010

CURRENT PROBLEMS OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF AQUATIC ORGANISMS. Volume I. Ecological Physiology and Biochemistry of Aquatic Organism. Collected Scientific Papers– Petrozavodsk: Karelian Research Centre RAS, 2010. – 320 p.

Editorial board:

Corresponding Member of RAS Nina N. Nemova, Institute of Biology Karelian Research Centre of RAS, Russia

Professor Grigoriy M. Chuiko, I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters of RAS, Russia

Ph. D. Olga V. Meshcheryakova, Institute of Biology Karelian Research Centre of RAS, Russia

Ph. D. Svetlana A. Murzina, Institute of Biology Karelian Research Centre of RAS, Russia

The edition has been supported by:

The Program of Russian Academy of Sciences 2009-2011 “Biological resource of Russia”.

ISBN 978-59274-0438-4

© Composite authors, 2010

© Institute of Biology, Karelian Research Centre, RAS, 2010

СОДЕРЖАНИЕ

Т.И. Андреенко. АСПЕКТЫ АДАПТАЦИОННОЙ СТРАТЕГИИ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА <i>ANADARA INAEQUIVALVIS</i> (BRUGÛIERE, 1789) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ	11
О.В. Василенко, П.Д. Клоченко, Т.А. Васильчук, Ю.В. Синюк. ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ, АЗОТНЫЙ И ФОСФОРНЫЙ ОБМЕН У СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ	17
О.Б. Васильева, В.В. Лаврова, Е.П. Иешко, Н.Н. Немова. ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ НАЛИМА <i>LOTA LOTA</i> (L.) ПРИ ИНВАЗИИ ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ <i>TRIAENOPHORUS NODULOSUS</i>	20
Р.У. Высоккая, С.А. Такшеев, В.С. Скидченко. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОТХОДОВ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА СОСТОЯНИЕ МАССОВЫХ ВИДОВ РЫБ КОСТОМУКШСКОГО ХВОСТОХРАНИЛИЩА ПО АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ	25
С.Б. Городовская, В.И. Шершнева. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ ГОНАД СОЗРЕВАЮЩИХ ОСОБЕЙ В ПЕРИОД ВЕСЕННЕ-ЛЕТНЕГО НАГУЛА И АНАДРОМНОЙ МИГРАЦИЙ В 2000 и 2007 гг.	31
И.И. Дорохова. ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРОВНЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В КРОВИ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ	40
И.И. Дорохова, Ю.В. Новоселова. ОСОБЕННОСТИ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕЧЕНИ МОРСКОГО ЕРША ИЗ БУХТ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ	44
А.Ф. Жуковская, В.П. Челомин. ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ ГОДОВАЛЫХ ОСОБЕЙ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА <i>MIZUNOPESTEN YESSOENSIS</i> К КАДМИЮ	49
В. Ф. Зайцев, Э. И. Мелякина, Л. Ю. Ноздрина. ПРИЧИНЫ СНИЖЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ	57
Н.Н. Камардин, Е.Л. Корниенко, Г.П.Удалова, С.В. Холодкевич. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА КАРДИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕФЛЕКСЫ У МОЛЛЮСКОВ	60
Н.П. Канцерова, Л.А. Лысенко, Н.Н. Немова. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ	68
А.О. Касумян. ОЦЕНКА РЫБАМИ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ВНУТРИРОТОВОЙ РЕЦЕПЦИИ: ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ	74
Т.Б. Ковыршина. ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ЧЕРНОМОРСКОГО БЫЧКА-КРУГЛЯКА <i>NEOGOBIUS MELANOSTOMUS</i> В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД	80
М.Ю. Крупнова, Н.Н. Немова, В.С. Скидченко. ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ МЕДИ И КАДМИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ МИДИЙ <i>MYTILUS EDULIS</i> L.	84
В.В. Крылов, Ю.Г. Изюмов, Ю.В. Чеботарева. ВЛИЯНИЕ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ И НИЗКОЧАСТОТНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА <i>RUTILUS RUTILUS</i> (L.) (СРАВНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ)	88

Т.В. Кузнецова, В.В. Трусевич, А.С. Куракин, С.В. Холодкевич, А.В. Иванов. ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА ОСНОВЕ ИХ КАРДИОАКТИВНОСТИ И ДВИГАТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ	93
В.В. Кузьмина. РОЛЬ СЕРОТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКЗОТРОФИИ У РЫБ	102
Н.С. Кузьмина, Е.Н. Скуратовская, И.И. Дорохова, А.В. Завьялов, А.В. Бердиева. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЧЕРНОМОРСКОГО МЕРЛАНГА В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ г. СЕВАСТОПОЛЯ	108
Е.И. Кяйвярйнен, Е.В. Борвинская, Г.Г. Серпунин, М.М. Куклина, Н.Н. Немова. РОЛЬ Na^+/K^+ АТФАЗЫ В БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	115
О.Н. Лукьянова, С.А. Ирейкина. БИОХИМИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БИОТЫ В ЭСТУАРНЫХ ЗОНАХ	121
Л.А. Лысенко, Н.П. Канцерова, Е.И. Кяйвярйнен, Н.Н. Немова, Н.А. Кашулин. ВЛИЯНИЕ Sr^{2+} НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ Ca^{2+}-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ РЫБ	127
Л.А. Лысенко, Е.И. Кяйвярйнен, М.Ю. Крупнова, Н.Н. Немова. РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У РЫБ	137
А.С. Маврин, В.И. Мартемьянов. СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ, МАГНИЯ В ПОЗВОНКАХ И ЧЕШУЕ ПЛОТВЫ <i>RUTILUS RUTILUS L.</i> В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД	140
В.И. Мартемьянов, А.С. Маврин. ПОРОГОВЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАТИОНОВ В ПРЕСНОЙ ВОДЕ НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ИОННОГО БАЛАНСА МЕЖДУ ОРГАНИЗМОМ ГИДРОБИОНТОВ И ВНЕШНЕЙ СРЕДОЙ ..	146
К. В. Метальникова. ГИСТОГЕНЕЗ ГОНАД, КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АНДРОГЕНАМИ НА <i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i> (WALBAUM) И <i>HUSO HUSO X ACIPENSER RUTHENUS</i> (ГИБРИД БЕСТЕРА (F_2))	151
О.В. Мещерякова, М.В. Чурова, Н.Н. Немова. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ЛАКТАТ- ОКИСЛЯЮЩИЙ КОМПЛЕКС И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА КЛЕТОК	163
Е.С. Михайлова, О.М. Исаева, А.О. Касумян. ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ВКУСОВЫХ СВОЙСТВ ПИЩЕВЫХ ОБЪЕКТОВ И ЕГО ТЕМПОРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ У РЫБ С РАЗНЫМ ТИПОМ ПИТАНИЯ	172
И.Г. Мурза, О.Л. Христофоров. РОСТ И ПОЛОВОЕ СОЗРЕВАНИЕ САМОК АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ <i>SALMO SALAR L.</i> БЕЗ НАГУЛА В ПРИРОДНЫХ ВОДОЁМАХ	176
С.А. Мурзина, Н.Н. Немова, З.А. Нефедова. ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ <i>CALANUS</i> – ОСНОВНЫХ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ АРКТИЧЕСКИХ ВИДОВ РЫБ (ОБЗОР) 193	
Н.Н. Немова. МЕХАНИЗМЫ БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ У ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ	198
З.А. Нефедова, С.А. Мурзина, Т.Р. Руоколайнен, П.О. Рипатти, Н.Н. Немова. ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАЗНЫХ ПОРЦИЙ ТЕКУЧЕЙ ИКРЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ <i>SALMO SALAR L.</i>	215
Т.Д. Орлова, И.А. Косевич. РОЛЬ НЕЙРОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССАХ РАЗВИТИЯ СТРЕКАЮЩИХ <i>AURELIA AURITA</i> (SCYPHOZOA) И <i>GONOTHYRAEA LOVENI</i> (HYDROZOA) И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НА СТАДИЯХ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА	219

Н.В. Панасюк. ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> (LAMARK, 1819) В КУРОРТНЫХ ЗОНАХ ЧЕРНОГО МОРЯ	226
Е.В. Пущина. ГАЗООБРАЗНЫЕ ПОСРЕДНИКИ В СТВОЛЕ И ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ СИМЫ <i>ONCORHYNCHUS MASOU</i>	231
Е.В. Пущина, Д.К. Обухов. NO И H₂S В ИНТЕГРАТИВНЫХ ЦЕНТРАХ МОЗГА СИМЫ <i>ONCORHYNCHUS MASOU</i>	238
А.Л. Рабинович, П.О. Рипатти. НЕОБЫЧНЫЕ ДЛИННЫЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЦЕПИ ФОСФОЛИПИДОВ: ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ (МЕТОД МОНТЕ-КАРЛО)	245
И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко, И.Н. Залевская. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОМАРКЕРОВ САМОК И САМЦОВ МОРСКОГО ЕРША <i>SCORPAENA PORCUS</i> LINNE (SCORPAENIDAE), ОБИТАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ	261
В.С. Скидченко, Р.У. Высоцкая. ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НУКЛЕАЗ У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РЫБ	266
В.В. Слободскова, Е.Е. Солодова, В.П. Челомин. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО	272
А.А. Солдатов. ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СОСТОЯНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ СЕТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МОРСКИХ РЫБ	278
И.В. Суховская, Е.В. Борвинская, Л.П. Смирнов. ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА НА СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ МУСКУЛАТУРЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ	283
Е.А. Фёдорова, Н.И. Щербакова. ВЛИЯНИЕ ДИМОКСИСТРОБИНА НА МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ <i>DAPHNIA MAGNA</i> STRAUS И <i>ACIPENCER RUTHINUS</i> L.	288
Н.Н. Фокина, Н.В. Лесонен, Т.Р. Руоколайнен, З.А. Нефедова, О.В. Фомина, Г.А. Шкляревич, Н.Н. Немова. ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ГЕПАТОПАНКРЕАСА <i>ASTERIAS RUBENS</i> L. КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ	291
С.В. Холодкевич, Т.В. Кузнецова, С.В. Сладкова, Г.П. Удалова, В.А. Любимцев. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФОРМИРОВАНИЮ РЕФЕРЕНТНЫХ ГРУПП БЕНТОСНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ОЦЕНОК ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ	297
М.В. Чурова, О.В. Мещерякова, Н.Н. Немова. ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИНЕЙНО-ВЕСОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК С АКТИВНОСТЬЮ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ В БЕЛЫХ МЫШЦАХ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП СИГОВ ИЗ ОЗЕРА КАМЕННОЕ (РЕСПУБЛИКА КАРЕЛИЯ)	304
В.Г. Шайда, Е.Н. Скуратовская, И.И. Руднева. ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АРТЕМИИ НА ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	312
В.В. Юрченко, Г.М. Чуйко. АКТИВНОСТЬ ЭТОКСИРЕЗОРУФИН-О-ДИЭТИЛАЗЫ (ЭРОД) РЫБ КАК БИОМАРКЕР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ СТОЙКИМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЗАГРЯЗНЯЮЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ	316

CONTENT

T.I. Andreenko. ASPECTS OF ADAPTABLE STRATEGY OF THE MOLLUSK-INVADER ANADARA INAEQUIVALVIS (BRUGUIERE, 1789) UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL STARVATION	16
O.V. Vasylenko, P.D. Klochenko, T.A. Vasilchuk, Y.V. Synyuk. THE INFLUENCE OF FULVIC ACIDS TO ENERGETIC, NITROGEN AND PHOSPHORUS METABOLISM IN BLUE-GREEN ALGAE	19
O.B. Vasiljeva, V.V. Lavrova, E.P. Ieshko, N.N. Nemova. CHANGE OF LIPID COMPOSITION OF LIVERS BURBOT LOTA LOTA (L.) AT INVASION OF PLEROCERCOID TRIAENOPHORUS NODULOSUS	24
R.U. Vysotskaya, S.A. Taksheev, V.S. Skidchenko. ESTIMATION OF THE ORE-MINING INDUSTRY WASTES EFFECT ON THE MASS FISH SPECIES OF THE KOSTOMUKSHSKOE RESERVOIR USING LYSOSOMAL ENZYMES ACTIVITY ASSAY	30
I.I. Dorohova. SPECIFIC PECULIARITIES OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN BLOOD OF THE BLACK SEA FISHES	43
I.I. Dorohova, J.V. Novoselova. PECULIARITIES OF MORPHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN SCORPIONFISH LIVER INHABITING IN BAYS WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIES INFLUENCE	48
A.F. Zhukovskaya, V.P. Chelomin. ASSESSMENT OF FEATURES IN BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION OF YOUNG GROWTH SCALLOPMIZUHOPECTEN YESSOENSIS	56
V.F. Zaitsev, E.I. Melyakina, L.Y. Nozdrina. REASONS FOR LOWERING THE CASPIAN SEAL POPULATION	59
N.N. Kamardin, E.L. Kornienko, G.P. Udalova, S.V. Kholodkevich. CHANGES OF HEART REACTIONS UNDER INFLUENCES OF HEAVY METAL IONS ON MOLLUSKS	67
N.P. Kantserova, L.A. Lysenko, N.N. Nemova. STRUCTURE AND PROPERTIES PECULIARITIES OF INTRACELLULAR CALCIUM-ACTIVATED PROTEASES IN INVERTEBRATE ANIMALS	73
A.O. Kasumyan. EVALUATION OF FOOD ITEM QUALITY BY INTRAORAL RECEPTORS IN FISHES: BEHAVIORAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS	78
T.B. Kovyrshina. ANTIOXIDANT ENZYMES SYSTEM PECULIARITIES IN ROUND-GOBY'S BLOOD NEOGOBIUS MELANOSTOMUS IN SPAWNING SEASON	83
M.Y. Krupnova, N.N. Nemova, V.S. Skidchenko. INFLUENCE OF HEAVY METALS (CD, CU) ON THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES MUSSEL MYTILUS EDULIS L.	87
V.V. Krylov, Yu.G. Izyumov, Yu.V. Chebotareva. ACTION OF TYPICAL MAGNETIC STORM AND WEAK LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELDS ON RUTILUS RUTILUS (L.) (COMPARISON OF THE EXPERIMENTAL DATA)	92
T.V. Kuznetsova, V.V. Trusevich, A.S. Kurakin, S.V. Kholodkevich, A.V. Ivanov. INVESTIGATIONS OF PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS IN BIVALVE MOLLUSKS BASED ON BIOMARKERS OF CARDIAC ACTIVITY AND VALVE MOVEMENTS	101
V.V. Kuz'mina. THE ROLE OF SEROTONIN IN FISH EXOTROPHY REGULATION	107
N.S. Kuz'minova, E.N. Skuratovskaya, I.I. Dorohova, A.V. Savyalov, A.V. Berdieva. THE MODERN STATE OF BLACK SEA WHITHIG IN COASTAL AREA OF SEVASTOPOL	114

E.I. Kaivarainen, E.V. Borvinskaya, G. G. Serpunin, M.M. Kuklina, N.N. Nemova. ROLE OF Na^+/K^+ ATPASE IN THE BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION TO ABIOTIC AND BIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS	120
O.N. Lukyanova, S.A. Ireykina. BIOCHEMICAL INDICES FOR BIOTA ASSESSMENT IN ESTUARIES ZONES	125
L.A. Lysenko, N.P. Kantserova, E.I. Kaivarainen, N.N. Nemova, N.A. Kashulin. THE EFFECT OF Sr^{2+} ON INTRACELLULAR Ca^{2+}-DEPENDENT PROTEASES IN FISH	136
L.A. Lysenko, E.I. Kaivarainen, M.Y. Krupnova, N.N. Nemova. ROLE OF INTRACELLULAR PROTEASES IN MUSCLE TISSUE DAMAGE IN FISH	139
A.S. Mavrin, V.I. Martemyanov. THE CONTENT OF NATRIUM, POTASSIUM, CALCIUM, MAGNESIUM IN VERTEBRAS AND SCALES OF ROACH RUTILUS RUTILUS L. DEPENDING ON GONAD MATURITY	145
V.I. Martemyanov, A.S. Mavrin. THRESHOLD CONCENTRATION OF CATION IN WATER NECESSARY FOR MAINTENANCE OF IONIC BALANCE BETWEEN AQUATIC ORGANISMS AND ENVIRONMENT	150
K.V. Metalnikova. HISTOGENESIS IN RESPONSE TO ANDROGENS IN ONCORHYNCHUS MYKISS (WALBAUM) AND HUSO HUSO X ACIPENSER RUTHENUS (HYBRID F₂)	162
O.V. Meshcheryakova, M.V. Churova, N.N. Nemova. MITOCHONDRIAL LACTATE OXIDATION COMPLEX AND ITS ROLE FOR CELL ENERGY HOMEOSTASIS	171
E.S. Mikhailova, O.M. Isaeva, A.O. Kasumyan. FEATURES OF TESTING BEHAVIOR AND ITS TEMPORAL CHARACTERISTICS FOR FLAVORED PELLET IN FISH WITH DIFFERENT FEEDING	175
I.G. Murza, O.L. Christoforov. GROWTH AND SEXUAL MATURATION OF ATLANTIC SALMON FEMALES IN CAPTIVE BROOD STOCK	192
S.A. Murzina, N.N. Nemova, Z.A. Nefedova. LIPID STAFF OF CALANUS – MAIN FOOD OBJECTS FOR ARCTIC FISH SPECIES (SHORT REVIEW)	197
N.N. Nemova. MECHANISMS OF BIOCHEMICAL ADAPTATIONS IN WATER ORGANISMS: ECOLOGICAL AND EVOLUTIONAL ASPECTS	214
Z.A. Nefedova, S.A. Murzina, T.R. Ruokolainen, P.O. Ripatti, N.N. Nemova. LIPID SPECTRUM OF DIFFERENT UNFERTILIZED EGG PORTIONS OF SALMO SALAR L.	218
T.D. Orlova, I.A. Kosevich. THE ROLE OF NEUROACTIVE SUBSTANCES DURING THE DEVELOPMENT OF CNIDARIA (AURELIA AURITA (SCYPHOZOA) AND GONOTHYRAEA LOVENI (HYDROZOA)) AND THEIR SPATIAL DISTRIBUTION IN EARLY ONTOGENESIS STAGES	224
N.V. Pansyuk. THE INFLUENCE OF THE MAN-CAUSED POLLUTION ON VIABILITY OF MUSSEL MYTILUS GALLOPROVINCIALIS (LAMARK, 1819) IN RESORT AREAS OF THE BLACK SEA	230
E.V. Pushchina. NO- AND H₂S-PRODUCING CELLS PRESENCE IN THE BRAIN STEM AND MEDULLAR PART OF THE SALMON ONCHORHYNCHUS MASOU BRAIN	237
E.V. Pushchina, D.K. Obukhov. NO AND H₂S PRODUCING SYSEMS IN SALMON ONCHORHYNCHUS MASOU TELENCEPHALIC AREAS	244
A.L. Rabinovich, P.O. Ripatti. UNUSUAL VERY LONG POLYENOIC CHAINS OF PHOSPHOLIPIDS: MONTE CARLO COMPUTER SIMULATION STUDY OF PROPERTIES	260
I.I. Rudneva, N.F. Shevchenko, I.N. Zalevskaya. MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MALE AND FEMALE OF SCORPION FISH (SCORPAENA PORCUS) EXPOSED IN CHRONIC ANTHROPOGENIC IMPACT	265

V.S. Skidchenko, R.U. Vysotskaya. TISSUESPECIFICITY OF LYSOSOMAL NUCLEASE ACTIVITY IN DIFFERENT FISH SPECIES	271
V.V. Slobodskova, E.E. Solodova, V.P. Chelomin. APPLICATION OF GENOTOXIC ANALYSIS FOR MONITORING OF COASTAL ZONE OF THE PITER THE GREAT BAY	277
A.A. Soldatov. EXPERIMENTAL HYPOTHERMIA INFLUENCE ON THE CAPILLARY NETWORK STATE OF MARINE FISHES SKELETAL MUSCLES	282
I.V. Sukhovskaya, E.V. Borvinskaya, L.P. Smirnov. THE EFFECT OF INDUSTRIAL WATERS OF MINING FACTORY ON LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDE'S COMPOSITION OF SOME SPECIES OF FISHES	287
E.A. Fedorova, N.I. Shcherbakova. AQUATIC TOXICITY OF DIMOXISTROBIN TO DAPHNIA MAGNA STRAUS AND ACIPENCER RUTHENUS L.	290
N.N. Fokina, N.V. Lesonen, T.R. Ruokolainen, Z.A. Nefedova, O.V. Fomina, G.A. Shklyarevich, N.N. Nemova. LIPID COMPOSITION OF HEPATOPANCREAS ASTERIAS RUBENS L. FROM KANDALAKSHA BAY OF THE WHITE SEA	296
S.V. Kholodkevich, T.V. Kuznetsova, S.V. Sladkova, G.P. Udalova., V.A. Lyubimtsev. METHODOLOGICAL APPROACHES FOR SELECTION OF REFERENCE GROUPS OF BENTHIC INVERTEBRATES BASED ON COMPLEX OF ASSESSMENTS OF THEIR FUNCTIONAL STATE	313
M.V. Churova, O.V. Meshcheryakova, N.N. Nemova. RELATIONSHIP BETWEEN GROWTH CHARACTERISTICS, ACTIVITIES OF SEVERAL ENZYMES AND GENETIC-MOLECULAR PARAMETERS IN WHITE MUSCLE OF WHITEFISH OF DIFFERENT AGES FROM LAKE KAMENNOE (REPUBLIC OF KARELIA)	311
V.G. Shaida, E.N. Skuratovskaya, I.I. Rudneva. RESPONSES OF ARTEMIA ON UV-RADIATION	315
V.V. Yurchenko, G.M. Chuiko. ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE (EROD) ACTIVITY IN FISH AS A BIOMARKER OF WATER POLLUTION WITH PERSISTENT ORGANIC CONTAMINANTS	319

АСПЕКТЫ АДАПТАЦИОННОЙ СТРАТЕГИИ МОЛЛЮСКА-ВСЕЛЕНЦА *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGUIERE, 1789) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ

Т. И. Андреевко

Севастопольский национальный технический университет, г. Севастополь, Украина
e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru

Введение

Живые организмы являются открытыми термодинамическими системами, существование которых требует постоянного притока вещества и энергии. Ограничение в питании и голод вызывают реорганизацию физиологических и биохимических процессов в организме, имеющую как адаптивную, так и компенсационную направленность. При этом для организмов разных систематических групп обнаружена специфика в переориентации данных процессов.

Отмечено, что среди гидробионтов наиболее чувствительными к условиям голодания являются костистые рыбы. В ответ на непродолжительную депривацию пищи (5–15 дней) происходит снижение общего и основного обмена, усиливаются процессы белкового катаболизма в тканях (Guderley et al, 2003; Shoemaker 2003), снижается индекс РНК/ДНК (Gao et al, 2004; Bowen, 2005), подавляется активность ряда ферментов (Qian, Chen, Sun, 2002; Guderley et al, 2003; Gao et al, 2004). Одновременно наблюдается резкое сокращение содержания глюкозы, гликогена, жиров т.е. энергетических ресурсов тканей (Gao et al, 2004; Hall, Short, Driedzic, 2006).

Ракообразные в отличие от представленной выше группы более устойчивы к голоданию. В условиях 14 суток депривации пищи у них также отмечается понижение как общего так и основного обмена (Thor, 2003; Comoglio et al, 2004), при этом происходит усиление гликолитических процессов в тканях (Comoglio et al, 2004). На начальных этапах голодания они активно используют углеводные ресурсы и триацилглицериды (Sanchez-Paz, 2007; Wu, 2007) и только в условиях длительного голодания (более 30 суток) наблюдается снижение

содержания белка в тканях (Wen, Ku, Zhou, 2007).

Что касается моллюсков, то информация о влиянии голодания на обменные процессы в тканях у этой группы организмов крайне ограничена. Установлено снижение содержания глюкозы и гликогена в гемолимфе (Carefoot et al, 1992), уменьшение частоты сердечных сокращений (Santini, Bianchi, Chelazzi, 2002). Особый интерес представляют моллюски-фильтраторы, так как у них в естественных условиях голодание не может быть полным, а только частичным, то есть недостаточным по калорийности и качественному составу получаемой пищи.

Цель настоящего исследования – изучить особенности адаптивной реорганизации белкового и углеводного метаболизма у *Anadara inaequalvis* в условиях полного голодания.

Материал и методы

В работе использовали особей *Anadara inaequalvis* с длиной раковины 30–33 мм. Материал был получен одномоментно с коллекторных установок рыбоводящего предприятия «Дон-Комп» (бухта Стрелецкая, Севастополь). Транспортировку животных осуществляли в пластмассовых контейнерах насыпью без воды в течение 1 ч от момента сбора. Перед проведением исследований животных выдерживали в стеклянных аквариумах объемом 30 л с проточной морской водой в течение 2–3 суток для снятия реакции стресса.

Морскую воду для эксперимента доставляли из 10-ти мильной зоны и подвергали термической обработке при 80–85 °С в течение 4-х часов. Затем ее пропускали через мембранный фильтр (Synpro – 2,5) под вакуумом. Экспериментальная часть работы выполнена на специ-

ально разработанном стенде, который позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде. В камеру объемом 13,5 л наливали заранее подготовленную воду и помещали 30 особей анадары. Контроль концентрации кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В течение опыта она не снижалась ниже 7 мг л⁻¹. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5123 (Польша). Температуру воды составляла 20±1 °С. Фотопериод – 12 часов день: 12 часов ночь. Экспозиция – 18 суток. Пробы тканей отбирали на 1-е, 6-е и 18-е сутки эксперимента. Ежедневно в опыте и контроле производили полную смену воды в емкостях для удаления метаболитов.

Препарирование тканей проводили при температуре 0–4 °С. Полученные образцы гепатопанкреаса, жабр и ноги упаковывали в пищевую фольгу и хранили в жидком азоте. В последующем навески тканей гомогенизировали с использованием в качестве трансформирующей среды 1,15% KCl. Для получения супернатанта гомогенаты подвергали центрифугированию при 6000 об мин⁻¹ в течение 15 минут. В работе использовали рефрижераторную центрифугу К-23D (Германия). Все процедуры выполняли при 0–4 °С.

В тканях моллюсков определяли: активности аланин- и аспаратаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) – динитрофенилгидрозиновым методом, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) по реакции с L-γ-глутамил-п-нитроанилидом, катепсина D по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина (Камышников, 2004). Все измерения выполняли при 25,0±0,5 °С. Одновременно в тканях определяли содержание белка по методу Лоури, аминного

азота по реакции с нингидрином, мочевины по реакции с диацетилмонооксимом, глюкозы глюкоксидазным методом, лактата ферментативным методом по скорости восстановления НАДН₂ и пирувата по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (Камышников, 2004). В работе использовали стандартные наборы реактивов: «Simco, Ltd» (при определении активностей АлАТ и АсАТ), ООО НПП «Филисит диагностика» (при определении активности ГГТП и содержания глюкозы) и «Lachema» (при определении содержания мочевины и лактата).

Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm Sx$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Результаты

В условиях экспериментального голодания изменения всех исследованных параметров у моллюсков имели выраженную тканевую специфику.

Гепатопанкреас. Содержание глюкозы в данном органе в течение первых 6-ти суток голодания не изменялось (табл. 1). Однако затем количество этого соединения в гепатопанкреасе уменьшилось на 40,0% (p<0,01). Это происходило на фоне снижения содержания лактата в ткани на 32,2%. Однако, различия не были статистически выражены в виду существенной вариабельности полученных значений. Количество пирувата, напротив, в первые 6 суток голодания увеличилось на 67,3% (p<0,05), а затем вернулось к исходным величинам – 0,9–1,1 нмоль мг⁻¹.

Таблица 1. Содержание глюкозы, лактата и пирувата в тканях анадары в условиях экспериментального голодания

Органы моллюска	n	Показатели		
		Глюкоза, нмоль мг ⁻¹	Лактат, нмоль мг ⁻¹	Пируват, нмоль мг ⁻¹
Гепатопанкреас				
Контроль	10	11,4±0,60	10,2±2,05	1,07±0,20
Голодание 6 суток	10	12,1±1,00	8,30±1,31	1,79±0,31
Голодание 18 суток	6	7,21±1,13	6,92±1,13	0,90±0,15
Жабры				
Контроль	10	3,80±0,65	6,73±1,28	0,69±0,09
Голодание 6 суток	10	3,31±0,87	5,87±0,93	1,25±0,21
Голодание 18 суток	6	0,52±0,23	3,79±0,75	1,43±0,26
Нога				
Контроль	10	1,55±0,59	2,86±0,42	3,94±0,11
Голодание 6 суток	10	1,52±0,48	2,02±0,29	0,75±0,05
Голодание 18 суток	6	1,03±0,14	1,85±0,14	1,00±0,07

Примечание: n – число особей

В условиях нашего эксперимента наблюдался рост содержания белка в гепатопанкреасе. Общий прирост, которого в течение эксперимента составил почти 40,0% ($p < 0,01$) (табл. 2). Это происходило на фоне уменьшения количества свободных аминокислот и мочевины в органе соответственно на 41,0% ($p < 0,01$) и 27,7% ($p < 0,05$). Изменение активностей АлАТ и АсАТ было слабо выражено (рис. 1). Небольшой рост был выявлен только относительно АсАТ – 17,7% ($p < 0,05$). При этом происходило подавление активности γ -ГТП на 33,1% ($p < 0,05$) (рис. 2). На 18-е сутки эксперимента активность лизосомального фермента катепсина D была в 3,5 раза выше ($p < 0,01$), чем в начале опыта (рис. 2).

Жабры. Содержание глюкозы в жабрах было в 3,0 раза ниже ($p < 0,001$), чем в гепатопанкреасе (табл. 1). Различие в начале и конце опыта (18-е сутки) составило 7,3 раза ($p < 0,001$). Голодание вызывало в тканях жабр также сниже-

ние содержания лактата на 43,7% и рост уровня пирувата в 2,1 раза ($p < 0,05$).

В сравнении с гепатопанкреасом изменение содержания белка и его метаболитов в жабрах анадары в ходе экспериментального голодания имела иную динамику (табл. 2). На 6-е сутки эксперимента содержание белка снижалось на 21,2% ($p < 0,01$) и затем не претерпевало статистически значимых изменений. Одновременно в органе уменьшалось количество аминного азота на 48,9% ($p < 0,001$). Это происходило на фоне роста содержания мочевины. Активности АлАТ, АсАТ, γ -ГТП и катепсина D в течение опыта не изменялись (рис. 1, 2).

Нога. Как и в других тканях, голодание вызывало понижение содержания глюкозы в ноге анадары. Это происходило на 18-е сутки эксперимента и составило 33,5% (табл. 1). Содержание лактата и пирувата уменьшилось на 6-е сутки наблюдений, в сравнении с контролем различия составляли 35,3 и 74,6% ($p < 0,001$) соответственно.

Таблица 2. Содержание белка, аминокислот и мочевины в тканях анадары в условиях экспериментального голодания

Органы моллюска	n	Показатели		
		Белок, мкг мг ⁻¹	Аминокислоты, мкг мг ⁻¹	Мочевина, нмоль мг ⁻¹
Гепатопанкреас				
Контроль	20	102,5±2,0	0,598±0,024	35,6±3,4
Голодание 6 суток	10	143,5±12,5	0,285±0,020	28,4±2,3
Голодание 18 суток	8	142,7±9,8	0,353±0,065	26,1±4,0
Жабры				
Контроль	20	59,5±2,0	0,378±0,014	7,81±1,12
Голодание 6 суток	10	46,9±4,0	0,193±0,013	11,8±4,15
Голодание 18 суток	8	47,2±2,8	0,199±0,026	10,3±2,89
Нога				
Контроль	20	31,9±1,0	0,102±0,003	2,65±0,43
Голодание 6 суток	10	38,7±1,2	0,068±0,003	2,68±0,24
Голодание 18 суток	8	42,3±0,4	0,089±0,007	2,66±0,47

Примечание: n – число особей

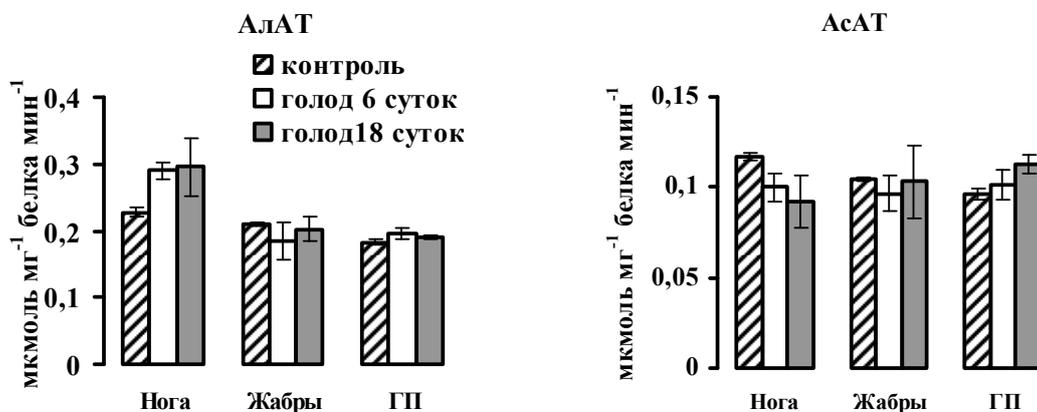


Рис. 1. Активности аминотрансфераз (АсАТ, АлАТ) в тканях анадары в условиях экспериментального голодания

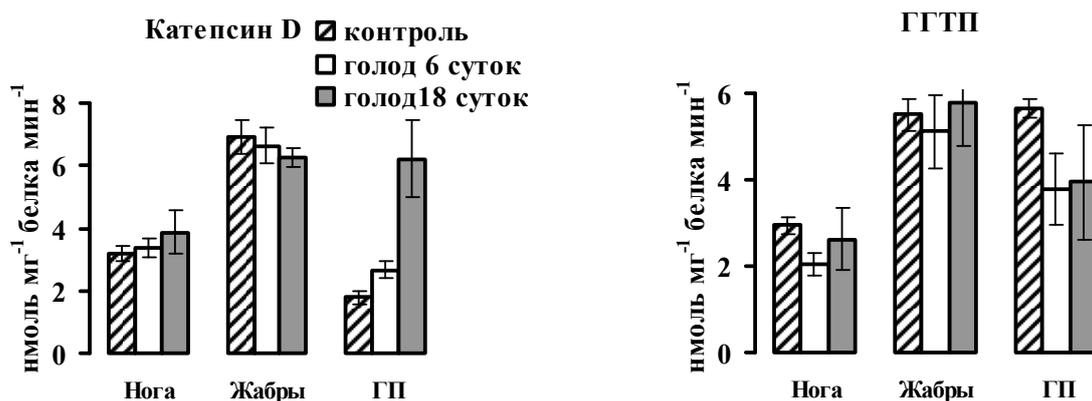


Рис. 2. Активности катепсина D и ГГТ в тканях анадары в условиях экспериментального голодания

Количество белка в ходе экспериментального голодания в тканях ноги анадары увеличивалось на 32,6% ($p < 0,001$), что совпадало с данными, полученными для гепатопанкреаса (табл. 2). Содержание же аминного азота при этом понижалось на 33,4% ($p < 0,001$), а мочевины не изменялось, оставаясь на уровне исходных величин. Изменение активностей АлАТ и АсАТ в течение опыта не совпадало (рис. 1). Активность АлАТ повышалась на 27,3% ($p < 0,001$), а АсАТ, напротив, понижалась на 14,5% ($p < 0,05$). Эти изменения отмечались уже на 6-е сутки эксперимента и наблюдались на фоне подавления активности γ -ГТП (рис. 2). В сравнении с исходным состоянием моллюска на 6-е сутки голодания активность γ -ГТП была на 27,6% ($p < 0,05$) ниже. К концу эксперимента она оказалась близкой к исходному состоянию. В отличие от гепатопанкреаса активность катепсина D в тканях ноги анадары не изменялась на протяжении опыта (рис. 2).

Обсуждение

Результаты настоящего исследования показали, что в условиях голодания реорганизация углеводного метаболизма во всех тканях анадары протекала однонаправлено. Наблюдалось снижение содержания глюкозы и лактата при одновременном росте или отсутствии изменений уровня пирувата. Отмеченные изменения развивались на 18-е сутки эксперимента, в течение первых 6-ти суток они не были выражены.

Снижение содержания лактата во всех исследуемых тканях позволяет предположить, что организм моллюска в условиях голодания покрывал дефицит питательных субстратов за счет тканевого ресурса данного соединения. Известно, что анадара в сравнении с другими видами

двустворок отличается повышенным содержанием тканевого лактата (Солдатов, Андреенко, Головина, 2008). Это позволяет моллюскам в отсутствие пищи продолжительный период времени не использовать организменный и тканевой ресурсы углеводов. Об этом свидетельствует то, что уменьшение содержания глюкозы в тканях анадары отмечалось только на 18 сутки эксперимента и не превышало 40%.

Влияние голодания на белковый метаболизм, в отличие от углеводного, привело к неоднозначным изменениям в тканях анадары.

Особый интерес вызвал рост содержания белка в тканях ноги и гепатопанкреаса моллюсков в условиях экспериментального голодания. В ряде работ также отмечается увеличение белковых ресурсов в тканях гидробионтов, но только на начальных этапах голодания (Frolov, Pankov, 1992; Qian, Chen, Sun, 2002). Это совпадает с нашими результатами. У анадары повышение содержания белка в тканях происходило в течение первых 6-ти суток эксперимента и в дальнейшем изменения не были выражены.

Необходимо отметить, что опубликованные материалы не дают однозначного объяснения причин роста содержания белка в тканях в условиях голодания. Известно, что стресс-синдром является первой стадией адаптации организма к экстремальным воздействиям, в том числе к отсутствию пищи (Меерсон, 1981). В ответ на действие стрессорных факторов концентрация в плазме некоторых белков, которые еще называют белками острой фазы, увеличивается и, следовательно, их синтез является составной частью метаболического ответа на стресс (Меерсон, 1981). Так, некоторые авторы отмечают увеличение количества эритроцитов и содержания гемоглобина в начальный период голодания гидробионтов (Borah, Yadav, 1996). Вероятно,

депривация пищи и приводила к развитию подобных процессов в тканях моллюсков, но они реализовались не на всех уровнях. Как уже отмечалось, в жабрах анадары содержание белка несколько понижалось.

Процесс адаптации моллюска к голоданию, по-видимому, шел и по пути активного использования аминокислот, как потенциального источника энергии. Содержание аминного азота во всех исследованных органах понижалось. При этом уровень мочевины в тканях не изменялся, а в некоторых случаях уменьшался (гепатопанкреас). Это означает, что снижение тканевого пула аминокислот не было связано с процессами дезаминирования. Использование аминокислот, как источника энергии тканями анадары, в условиях голодания происходит, по-видимому, в направлении фумаратредуктазной и сукцинат-тиокиназной реакций, которые позволяют дополнительно получать гликолитические метаболиты. Об этом свидетельствует рост активностей АлАТ и АсАТ на фоне снижения активностей γ -ГТП в ряде тканей. Донором аминокислот, вероятно, выступает гепатопанкреас, так как только в этом органе отмечался существенный рост активности катепсина D. Известно, что аминокислоты могут быть использованы в углеводном обмене, а также при синтезе протеинов острой

фазы. Такой механизм рассматривается в работе ряда авторов (Okuma, Watanabe, Abe, 1998).

Выводы

1. На начальных этапах голодания (6 суток) анадара покрывает дефицит питательных веществ за счет ресурсов тканевого лактата. Об этом свидетельствует снижение содержания лактата во всех тканях моллюска на 30–35%.

2. Процесс адаптации анадары к голоданию на начальных этапах (6 суток) идет по пути использования резерва аминокислот в процессах биосинтеза белка. Это отражает уменьшение количества аминного азота на 33–41% во всех исследованных тканях и рост содержания белка на 33–40% в ноге и гепатопанкреасе при отсутствии выраженных изменений концентрации мочевины в органах моллюска.

3. В условиях более длительного голодания (на 18-е сутки) аминокислоты (аспартат и аланин) используются, вероятно, в качестве энергетических субстратов. Об этом свидетельствует рост активности АлАТ и АсАТ в ряде тканей. Это позволяет поддерживать процессы аэробного гликолиза. Донором аминокислот выступает гепатопанкреас, именно в его тканях отмечается значительный рост активности катепсина D – в 3–5 раз.

Литература

Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 501 с.

Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 278 с.

Солдатов А. А., Андреев Т. И., Головина И. В. Особенности организации тканевого метаболизма у двусторчатого моллюска-вселенца *Anadara inaequalis* Bruguiere // Доп. НАН України. – 2008. – N 4. – С. 161–165.

Borah S., Yadav R.N.S. Biochemical and hematological responses to starvation in an air breathing fresh water teleost *Heteropneustes fossilis* (Bloch) // Indian J. Fish. – 1996. – 43, № 3. – P. 307–311.

Bowen K.L., Johansson O.E., Smith R., Schleichtrien C., Arts M.T. RNA/DNA and protein Indices in Evaluating Growth and Condition of Aquatic Organisms: A Review // Ann. Conf. Great Lakes Res. – 2005. – 48. – P. 34–39.

Carefoot T.H., Qian P-Y., Taylor B.E., West T.G., Osborne J. Effect of starvation on blood-glucose and tissue-glycogen levels in the northern abalone *Haliotis kamtschatkana* // J. Shellfish Res. – 1992. – 11, № 2. – P. 551.

Comoglio L. I., Gaxiola G., Roque A., Cuzon G., Amin O. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* // J. Shellfish Res. – 2004. – 23, № 1. – P. 243–249.

Frolov A.V., Pankov S. L. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. – 1992. – 72, N 2. – P. 343–356.

Gao L., Chen L., Zhao X., Zhuang P. Starvation and compensatory growth of *Acipenser schrenckii* juveniles – effects on digestive organs structure and digestive enzymes activity // J. Fish. Sci. China. – 2004. – 11, № 5. – P. 413–419.

Guderley H., Lapointe D., Bedard M., Dutil J-D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. // Comp. Biochem. Physiol., – 2003. – 135A, № 2. – P. 347–356.

Hall J.R., Short C.E., Driedzic W. R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose // J. Exp. Biol. – 2006. – 209, № 22. – P. 4490–4502.

Okuma E., Watanabe K., Abe H. Distribution of free D-amino acids in bivalve mollusks and the effects of physiological conditions on the levels of D- and L-alanine in the tissues of the hard clam, *Meretrix lusoria* // *Fish. Sci.* – 1998. – 64, N 4. – P. 606–611.

Qian Y., Chen H., Sun J. Effects of starvation on the hematological and blood biochemical indices in cultured *Lateolabrax japonicus* // *J. Fish. Sci. China.* – 2002. – 9, № 2. – P. 133–137.

Sanchez-Paz A., Garcia-Carreno F., Hernandez-Lopez J., Muhlia-Almazan A., Yepiz-Plascencia G. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2007. – 340, № 2. – P. 184–193.

Santini G., Bianchi T., Chelazzi G. Metabolic responses to food deprivation in two limpets with different foraging

regimes, revealed by recording of cardiac activity // *J. Zool.* – 2002. – 256, № 1. – P. 11–15.

Shoemaker C.A., Klesius P.H., Lim C., Yildirim M. Feed deprivation of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), influences organosomatic indices, chemical composition and susceptibility to *Flavobacterium columnare* // *J. Fish Dis.* – 2003. – 26, № 9. – P. 553–561.

Thor P. Elevated respiration rates of the neritic copepod *Acartia tonsa* during recovery from Starvation // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2003. – 283, № 1–2. – P. 133–143.

Wen X., Ku Y., Zhou K. Starvation on changes in growth and fatty acid composition of juvenile red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* – 2007. – 25, № 1. – P. 97–105.

Wu L., Liu Yu., Wang X., Deng H. The effects of starvation and refeeding on metabolism in shrimp (*Marsipenaeus japonicus*) // *J. Dalian Fish. Univ.* – 2007. – 22, № 2. – P. 109–112.

ASPECTS OF ADAPTABLE STRATEGY OF THE MOLLUSK-INVADER *ANADARA INAEQUIVALVIS* (BRUGÛIERE, 1789) UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL STARVATION

T.I. Andreenko

Sevastopol national technical university, Sevastopol, Ukraine
e-mail: tatyana-andreenk@mail.ru

The effect of starvation on the orientation of metabolic processes in mollusk-invaser *Anadara inaequivalvis* (Black sea) was investigated under experimental conditions. The experiment lasted up to 18 days. It was shown that during initial stages of starvation (6 day) *Anadara inaequivalvis* used a resource of tissue lactate in direction of oxidative decarboxylation reactions. The process of *Anadara*

inaequivalvis adaptation to starvation involves using the amino acids reserves during tissue biosynthesis. Using of amino acids as an energy source for tissue during starvation occurs in the from fumarate reductase and succinate thiokinase reactions which allow to obtain additionally glycolytic metabolites. Hepatopancreas is found to be a donor of amino acids.

ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ, АЗОТНЫЙ И ФОСФОРНЫЙ ОБМЕН У СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

О. В. Василенко¹, П. Д. Клоченко², Т. А. Васильчук², Ю. В. Синюк¹

¹Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка, г. Тернополь, Украина,

²Институт гидробиологии НАН Украины, г. Киев, Украина,

e-mail: VasylenkoO@mail.ru

Введение

Одной из наиболее распространенных групп органических соединений в поверхностных водах являются гумусовые вещества (Перминова, 2000). Преобладающую их часть составляют фульвокислоты (ФК). Последние оказывают значительное влияние на жизнедеятельность и биопродуктивность гидробионтов, поэтому важной задачей является установление механизмов этого воздействия.

Материалы и методы

Целью наших исследований было изучение влияния ФК на азотный, фосфорный и энергетический обмен у синезеленой водоросли *Calothrix braunii* Born. et Flah. HPDP-16, которую культивировали на среде Фитцджеральда при температуре 25 ± 1 °С и освещении лампами дневного света (2500 лк). Изучали активность ключевых ферментов: НАДН-глутаматдегидрогеназы, щелочной фосфатазы (ЩФ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) при воздействии на них ФК в концентрациях 30 и 80 мг/дм³. Образцы для анализов отбирали на 1, 3, 7 и 14-е сутки выращивания. В качестве контроля использовали культуру без ФК в питательной среде.

Для изучения активности ферментов готовили гомогенаты их биомассы (клетки отделяли от среды с помощью мембранных фильтров Сынпор № 4). Биомассу водорослей гомогенизировали в охлажденном буферном растворе (рН 7,4) следующего состава: 0,5 М сахароза, 0,005 М ЕДТА, 0,01 М КСl и 0,001 М MgCl₂ в соотношении 1:5 (сырая масса : буфер).

Активность сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) определяли ферроцианатным методом (Методы..., 1982). При этом инкубационная

смесь содержала 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,8), 0,1 М янтарной кислоты, 0,025 М ЕДТА и 25 мМ K₃[Fe(CN)₆]. Реакцию останавливали внесением 20% трихлоруксусной кислоты. Спектрофотометрию осуществляли при длине волны 420 нм.

Активность НАДН-глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) определяли спектрофотометрически по скорости окисления НАДН при 340 нм (Софин, Шатилов, Кретович, 1984) в реакционной смеси, состоящей из 0,05 М трис-НСl буфера (рН 7,2), 0,01 М 2-оксоглутарата, 0,000025 М НАДН и 0,2 М (NH₄)₂НРО₄.

Активность щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) устанавливали по расщеплению фенолфосфата с образованием фенола, окисленное соединение которого с 4-аминофеназоном образует красную окраску раствора, регистрируемую спектрофотометрически при длине волны 490 нм (Камышников, 2000). В ходе работы использовали Na⁺-Na⁺-карбонатный буфер (рН 10,0).

Содержание белка в клетках водорослей определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Полученные данные обработаны методами вариационной статистики (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Исследования показали заметное влияние ФК на изучаемые ферменты. СДГ – единственный фермент цикла трикарбоновых кислот, принимающий непосредственное участие в образовании макроэргической фосфатной связи, является наиболее чувствительным звеном дыхательной цепи (Маевский, Кондрашова, 1978). После внесения ФК в среду в концентрации 30 мг/дм³ показатели активности СДГ были выше контрольных в 1,6, 5,2 и 2,5 раза, соответственно, на 1-е, 3-е и 7-е сутки. На 14-е сутки эксперимента

активность фермента была близка к показателям в контрольном варианте. Под влиянием ФК в концентрации 80 мг/дм³ также наблюдали увеличение активности исследуемого фермента: на 1-е сутки – в 3,8 раза, на 3-и – в 3,0 раза и на 7-е сутки – в 3,3 раза (по сравнению с контролем). На 14-е сутки величины активности СДГ лишь незначительно превышали показатели в контрольном варианте, но были ниже, чем при концентрации ФК 30 мг/дм³. Следует также отметить, что в случае действия ФК в концентрации 30 мг/дм³ максимум активности фермента наблюдался на 3-и сутки, а при концентрации 80 мг/дм³ – на 1-е сутки опыта.

Противоположное действие оказали ФК на активность НАДН-глутаматдегидрогеназы, активность которой снижалась уже с 1-х суток эксперимента как при концентрации ФК 30 мг/дм³ (в 10,3 раза), так и при 80 мг/дм³ (в 4,4 раза) по сравнению с контролем. На 3-и и 7-е сутки опыта показатели несколько увеличивались, но при этом были все же меньше контрольных значений в 3,9 и 3,5 раза, соответственно. На 14-е сутки активность фермента несколько повышалась по сравнению с предыдущими показателями при концентрации ФК 30 мг/дм³, однако была ниже контрольного варианта в 1,5 раза, а при 80 мг/дм³ – в 9,3 раза. Следует отметить, что резкое уменьшение активности исследуемого фермента в первый день эксперимента, возможно, связано с увеличением содержания в клетках АТФ – аллостерического ингибитора НАДН-глутаматдегидрогеназы, об усилении синтеза которого свидетельствует увеличение активности СДГ.

Активность ЩФ также ингибировалась под влиянием ФК, однако несколько меньше, чем других изученных ферментов. Так, при действии ФК в концентрации 30 мг/дм³ активность фермента на первые сутки опыта снижалась в 1,5 раза, а на 3-и – в 2,2 раза. В то же время, на 7-е сутки эксперимента наблюдалось небольшое возрастание активности ЩФ, а на 14-е сутки она

снова уменьшалась (в 2,8 раза в сравнении с контролем). При концентрации ФК 80 мг/дм³ отмечалось ингибирование активности фермента на протяжении всего эксперимента. В частности, на первые сутки регистрируемый показатель был ниже контрольного в 1,2 раза, а на 14-е – в 1,9 раза. Возможно, что ФК, благодаря комплексобразующей способности, связывают такие необходимые для функционирования ЩФ ионы, как Zn⁺² и Mg⁺².

Заключение

Таким образом, наличие в водной среде фульвокислот можно расценивать как важный фактор, оказывающий влияние на метаболизм синезеленых водорослей в зависимости от времени воздействия и концентрации в среде. Известно (Гандзюра, Грубинко, 2008), что для адаптации организма к токсичной среде эффективное функционирование метаболических систем является наиболее показательным критерием. В случае с СДГ наблюдаемое повышение ее активности может быть связано с включением компенсаторных механизмов энергообразования при повышенных затратах энергии (Парахонский, 2005), в то время как снижение активности фермента на 14-е сутки воздействия ФК, вероятно, можно объяснить исчерпыванием адаптационных механизмов энергетического обмена. Последнее может служить объяснением ингибирования ферментов азотного и фосфорного обмена. Поскольку ЩФ является ферментом широкого спектра действия (участвует в фосфорном, углеводном, липидном и нуклеотидном обмене), изменения ее активности может быть связано с нарушением функционирования любого из этих звеньев метаболизма (Ленинджер, 1985). Ингибирование ЩФ, а также НАДН-глутаматдегидрогеназы, на протяжении всего эксперимента свидетельствует об отсутствии у синезеленых водорослей надежного механизма адаптации к воздействию фульвокислот в исследованных концентрациях.

Литература

Гандзюра В. П., Грубинко В. В. Поняття шкодочинності в екології // Наук. зап. ТНПУ ім. В. Гнатюка. – Серія: Біологія. – 2007. – № 1 (31). – С. 11–31.

Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – С. 395–404.

Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 351 с.

Ленинджер А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1985. – 1022 с.

Маевский Е. И., Кондрашова М. Н. Сукцинатная фракция дыхания – наиболее чувствительная характеристика митохондрий при небольших изменениях физиологического состояния животных // Митохондриальные процессы во временной организации жизнедеятельности: Мат. Всесоюз. Сем. Регуляция энергетического обмена и фи-

зиологического состояния. – Пушино, 1978. – С. 63.

Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохорова. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 273 с.

Парахонский А. П. Механизмы индукции адаптивных и иммунных реакций // *Современные наукоемкие технологии.* – 2005. – № 9. – С. 63.
Перминова И. В. Анализ, классификация и прогноз

свойств гумусовых кислот: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. – М., 2000. – 50 с.

Софин А. В., Шатилов В. Р., Кретович В. Л. Глутаматдегидрогеназы одноклеточной зеленой водоросли. Кинетические свойства // *Биохимия.* – 1984. – 49, № 2. – С. 334–345.

Lowry O. H., Rosenbroug N. I., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.

THE INFLUENCE OF FULVIC ACIDS TO ENERGETIC, NITROGEN AND PHOSPHORUS METABOLISM IN BLUE-GREEN ALGAE

O.V. Vasylenko¹, P.D. Klochenko², T.A. Vasilchuk², Y.V. Synyuk¹

¹ *Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University of Ternopil, Ternopil, Ukraine*

² *Institute of Hydrobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*
e-mail: VasylenkoO@mail.ru

The influence of fulvic acids in concentration of 30 mg/dm³ and 80 mg/dm³ on energetic (succinate dehydrogenase), nitrogen (glutamate dehydrogenase) and phosphorus (alkaline phosphatase) metabolism in blue-green (*Calothrix braunii* Born. et Flah.) algae was investigated. Increased activity of succinate dehydrogenase was detected. In case of fulvic acids influence in concentration 30 mg/dm³ the activity

peak was observed on 3 day, at 80 mg/dm³ – on 1 day. On the 14 day of experiment the activity of succinate dehydrogenase was close to control. Both concentrations of fulvic acids decreased glutamate dehydrogenase and alkaline phosphatase activity. Concluded that the reliable adaptation mechanism of blue-green to fulvic acids influence in investigated concentrations is absent.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ НАЛИМА *LOTA LOTA* (L.) ПРИ ИНВАЗИИ ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

О. Б. Васильева, В. В. Лаврова, Е. П. Иешко, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: vasil@krc.karelia.ru

Введение

Для системы «паразит – хозяин» свойственен антагонизм (Давыдов, 1991; Thomas, 2002; Barrett, 2009). Паразит использует хозяина в качестве среды обитания и источника питания, адаптируясь соответствующим образом к его биохимическим особенностям, поскольку, как известно, гельминты не способны самостоятельно синтезировать многие вещества (Высоцкая, Сидоров, 1989). В тоже время инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей, направленные на избирательное поглощение питательных веществ, и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в органах. В связи с этим развивается ответная реакция хозяина, направленная на поддержание функционирования зараженных органов, т.е. компенсацию паразитарного воздействия (Давыдов, Микряков, 1998).

Среди цестод, которые вызывают массовые инвазии и гибель ценных промысловых рыб, значительное место занимает *Triaenophorus nodulosus* из отряда *Pseudophyllidea*. Целью данной работы являлся сравнительный анализ основных липидных компонентов гельминтов *Triaenophorus nodulosus*, окружающих их капсул и инвазированной печени налима *Lota lota* (L.).

Материалы и методы

Объектами исследования данной работы являлись налим *Lota lota* (L.) и инкапсулированные гельминты *Triaenophorus nodulosus* на стадии плероцеркоида. Отлов рыбы проводился из Онежского озера в летний период (август), поскольку экстенсивность и интенсивность заражения плероцеркоидами *T. nodulosus* нарастает с июня по август (Билич, Крыжановский, 2002;

Letherman, 2007). В данный период налимом активно питаются планктонными рачками, зараженными плероцеркоидами возбудителя.

Для липидного анализа взяты пробы печени, плероцеркоидов и их капсул. Среди зараженных рыб отбирали варианты с разной степенью инвазии. Критерием оценки низкой степени заражения служили образцы печени с 1–6 плероцеркоидами, для высокой степени инвазии – печень налима, содержащая более 20 плероцеркоидов. Контролем являлась свободная от инвазии печень. Чтобы уменьшить возможное влияние на липидный состав других факторов, кроме заражения, для сравнения отбирали контрольную и зараженную рыбу с одинаковыми морфологическими, физиологическими и экологическими параметрами (размер, вес, пол, место и время отлова).

Липидный статус оценивали по следующим показателям: общие липиды: триацилглицерины, фосфолипиды, холестерин и его эфиры; общие фосфолипиды: фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин. Фиксацию проб осуществляли смесью Фолча (хлороформ/ метанол в соотношении 2/1, по объему) (Folch et al., 1957). Общие липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей: петролейный эфир/ диэтиловый эфир/ уксусная кислота (в соотношении 90/10/1, по объему). Идентификацию отдельных пятен проводили общепринятыми спектрофотометрическими методами (Сидоров и др., 1972; Engelbrecht et al., 1974). Анализ отдельных фракций фосфолипидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Arduini et al., 1996). Фракционирование осуществлялось на стальной колонке, элюент состоял из смеси растворителей: ацетонитрил/ гексан/ метанол/ фосфорная кислота в соотношении

918/30/30/17,5, по объему. Для обработки данных применялись общепринятые методы вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2003).

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного анализа гельминтов *Triaenophorus nodulosus*, капсул и инвазированной печени налима *Lota lota* (L.) установлена качественная идентичность их липидного состава. Во всех образцах содержатся основные фракции общих липидов – запасные (триацилглицерины и эфиры холестерина) и структурные (фосфолипиды и холестерин). Однако отмечены различия в количественном содержании отдельных липидных компонентов.

Установлено высокое содержание триацилглицеринов в инвазированной печени в отличие от гельминтов, для которых характерна высокая концентрация структурных липидов. Преобладание структурных компонентов над содержанием запасных липидов у плероцеркоидов, по-видимому, связано с особенностями их жизнедеятельности. *T. nodulosus*, паразитирующие в печени налима, находятся в условиях низкого парциального давления кислорода, поэтому необходимую энергию

они получают, главным образом, за счет анаэробного расщепления углеводов. Триацилглицерины в качестве источника энергии в этих условиях, видимо, используются ограниченно (Сидоров, 1983; Комов, Шведова, 2004). Характерной особенностью *T. nodulosus*, как и всех цестод, является отсутствие пищеварительной системы, поэтому поглощение гельминтами необходимых веществ осуществляется через всю поверхность тела (Билич, Крыжановский, 2002; Brinker, Hamers, 2007). В связи с этим, особое значение для функционирования покровного эпителия паразита имеет степень вязкостности клеточных мембран, которая определяется соотношением основных структурных компонентов биомембран – фосфолипидов и холестерина (ХС/ФЛ), а среди суммарных фосфолипидов – соотношением фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (ФХ/ФЭА). В ходе данного исследования у гельминтов, по сравнению с инвазированной печенью, установлено более низкое значение соотношения ФХ/ФЭА и более высокое значение ХС/ФЛ, что может свидетельствовать о повышении жидкостности мембран у *T. nodulosus* и, возможно, указывает о специфической адаптации внешних покровов гельминта для поглощения веществ (таблица).

Липидный состав капсул и гельминтов *Triaenophorus nodulosus* и печени налима *Lota lota* (L.)

	Печень			Капсула	Гельминт
	без инвазии (контроль)	низкая степень инвазии	высокая степень инвазии		
Общие липиды, % сухой массы					
Общие липиды	74,83	72,79	46,32 ^a	27,07 ^{c,d}	15,88 ^b
Фосфолипиды	24,29	22,01	20,10 ^a	13,62 ^{c,d}	7,13 ^b
Триацилглицерины	39,01	39,60	19,24 ^a	7,40 ^c	3,16 ^b
Холестерин	10,51	9,26	5,62	5,35	5,28
Эфиры холестерина	2,02	1,92	1,36	0,70	0,31 ^b
Холестерин / фосфолипиды	0,43	0,42	0,28 ^a	0,39	0,74 ^b
Индивидуальные фосфолипиды, % сухой массы					
Фосфатидилинозитол	0,68	0,87	1,60 ^a	1,41 ^d	1,70
Фосфатидилсерин	0,75	0,83	1,21 ^a	1,13 ^d	0,98 ^b
Фосфатидилэтаноламин	5,72	6,08	5,40	3,89	1,99 ^b
Фосфатидилхолин	16,48	13,65 [*]	9,85 ^a	5,86 ^{c,d}	1,52 ^b
Лизофосфатидилхолин	0,19	0,18	1,04 ^a	0,74 ^{c,d}	0,10 ^b
Сфингомиелин	0,37	0,39	0,82 ^a	0,54 ^c	0,74
Фосфатидилхолин / фосфатидилэтаноламин	2,88	2,23	1,82 ^a	1,51 ^{c,d}	0,76 ^b
Жирные кислоты, % суммы ЖК					
18:2(n-6) линолевая кислота	2,70	1,51 [*]	2,48	1,47 ^{c,d}	1,25 ^b
16:0 пальмитиновая кислота	14,89	12,47 [*]	19,42 ^a	17,51	16,03 ^b
Ненасыщенные ЖК	73,57	73,52	66,35 ^a	62,60 ^c	62,34 ^b
Насыщенные ЖК	26,43	29,14	33,65 ^a	37,41 ^c	37,66 ^b
Сумма n-3	11,98	11,90	8,79	13,73 ^{c,d}	16,76 ^b
Сумма n-6	7,14	6,48	7,01	9,21 ^c	7,76 ^b
Насыщенные / ненасыщенные ЖК	0,36	0,39	0,51 ^a	0,59 ^c	0,60

* Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении печени с низкой степенью инвазии и контроля.

^a Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении печени с высокой степенью инвазии и контроля.

^b Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении *T. nodulosus* и печени с высокой степенью инвазии.

^c Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении капсул и печени с высокой степенью инвазии.

^d Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении капсул и *T. nodulosus*.

T. nodulosus, в отличие от кишечных гельминтов, для более эффективного извлечения необходимых соединений из печени должны разрушить окружающие клетки или изменить их проницаемость. В данном случае, плероцеркоиды действуют экзоферментами (протеазы, липазы, фосфолипазы, гиалуронидазы и др.) и/или сильными детергентами, лизирующими мембрану окружающих паразита клеток хозяина (Гурьянова, 1981; Давыдов, Микряков, 1998). Одним из таких детергентов является лизофосфатидилхолин, который в физиологических концентрациях играет роль медиатора, а при увеличении содержания данный фосфолипид нарушает структурную целостность клеточных мембран и, как следствие, может привести к лизису клеток (Сидоров, 1983; Комов, Шведова, 2004; Gallo et al., 1984; Colles, Chisolm, 2000). В данном исследовании установлен более высокий уровень лизофосфатидилхолина в инвазированной печени по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении проницаемости мембран клеток печени, и, возможно, обеспечивает облегченное поглощение гельминтами из нее необходимых для своей жизнедеятельности соединений (таблица).

Антагонизм между гельминтами и хозяином характеризуется воздействием паразита на зараженный орган и активацией компенсаторных механизмов организма хозяина, в том числе на биохимическом уровне. При инвазии в печени налима происходят изменения в содержании структурных липидных компонентов, которые, как известно, влияют на фазовое состояние биологических мембран (Крепс, 1981; Mazumdar et al., 2005). Нарушение жидкости биомембран может привести к подавлению функций зараженного органа и развитию патологических процессов, поэтому в организме хозяина развивается ответная реакция в виде модификации липидного состава, направленной на возвращение физического состояния мембран к тому, которое было до паразитарного воздействия. Для поддержания нормального функционирования в инвазированной печени налима происходят изменения содержания мажорных (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина) и минорных (фосфатидилсерина, сфингомиелина) фосфолипидов, степени ненасыщенности жирных кислот, что отражается на значениях такого показателя, как соотношение насыщенных жирных кислот к ненасыщенным (НЖК/ПНЖК), и изменяется соотношение (n-6) и (n-3) жирных кислот в сторону увеличения насыщенности и, как следствие, повышению жесткости биомем-

бран, направленные на поддержание структурной целостности и нормализацию вязкости мембран клеток печени (таблица). Таким образом, ферментные системы гельминтов вызывают разжижение мембран клеток зараженного органа для получения веществ, в то время как в печени активируется компенсаторная реакция, направленная на обеспечение более плотной упаковки бислоя, препятствуя увеличению его жидкости.

Капсулы имеют особое значение для поддержания нормальной жизнедеятельности гельминтов, поскольку они защищают паразитов от специфических антител хозяина и участвуют в поглощении веществ из зараженного органа (Березанцев, 1973; Давыдов, Микряков, 1998; Swiderskia, Xylander, 2000). Согласно литературным источникам, вопрос о механизме формирования капсул является дискуссионным. Существует мнение, что капсулы образуются в результате иммунологических реакций хозяина, т.к. тканевые паразиты, которым является *T. nodulosus* являются высокоантигенными и при попадании в организм хозяина активизируют его специфические и неспецифические иммунные реакции. Таким образом, капсулы – результат защитных реакций хозяина в ответ на действия гельминта (Давыдов, Микряков, 1998). Согласно другим литературным источникам, капсулы синтезируются самим паразитом для защиты от специфических антител и ферментных систем хозяина (Высоцкая, Сидоров, 1989). По результатам гистологических исследований Прониной (1988) клеточные слои капсул состоят из структур двойственного происхождения: наружных, более сходных по своему составу к тканям хозяина, и внутренних, более сходных с составом гельминтов. В результате данного исследования установлено качественное соответствие липидного состава капсул, гельминтов и печени. По количественному содержанию липидных и фосфолипидных компонентов капсулы занимают промежуточное положение между паразитами и зараженным органом, а по жирнокислотному составу капсулы более сходны с плероцеркоидами, чем с тканью печени (таблица).

Для оценки влияния паразитарной инвазии плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus* на липидный состав печени налима *Lota lota* (L.) проведен сравнительный анализ липидного состава печени налима с разной степенью заражения и свободной от инвазии печени (контроль). Установлено соответствие концентраций липидных

компонентов в печени с низкой степенью инвазии и контролем, что, вероятно, обусловлено недостаточным уровнем заражения для изменения липидных концентраций. Исключения составляют фосфатидилхолин, пальмитиновая (16:0) и линоленовая (18:3(n-3)) кислоты (таблица), поскольку изменение концентрации данных компонентов в печени налима при низкой степени инвазии, вероятно, является первичным ответом на паразитирование плероцеркоидов. Как известно, некоторые липидные компоненты используются в качестве маркеров для определения физиологического состояния организма (Сидоров, 1983; Немова, Высоцкая, 2004; Askman, 1997). В связи с этим, фосфатидилхолин и данные жирные кислоты могут применяться для оценки степени влияния инвазии на печень рыб.

Показано, что при высокой степени инвазии уровень триацилглицеринов в печени снижается практически в 2 раза (таблица). Печень активно участвует в обменных процессах, являясь основным органом метаболизма липидов. Кроме того, у налима печень является еще и основным органом депонирования запасных липидов – триацилглицеринов (Мельянцева, 1986; Лизенко, Болгова, 1987; Cowey, 1987). Многие процессы, такие как генеративные (созревание гонад, нерест и др.) и сезонные (нагул, зимовка и др.), находятся в непосредственной зависимости от уровня запасных липидов, которые необходимы рыбам для обеспечения нормальной жизнедеятельности. Снижение концентрации триацилглицеринов может привести к нарушению жизнеспособности налима, вплоть до его гибели.

В липидном составе печени с высокой степенью заражения установлены количественные изменения не только в содержании запасных ли-

пидов, но и в концентрации структурных компонентов. Печень примерно на 80% состоит из мембран и ее работа определяется, прежде всего, их нормальным функционированием, поэтому изменения в содержании структурных липидов в зараженном органе может свидетельствовать о нарушении метаболизма в гепатоцитах и, как следствие, возможном развитии деструктивных процессов. Известно, что жировая дистрофия печени сопровождается изменениями в фосфолипидном составе мембран клеток, а именно снижается уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, возрастает содержание сфингомиелина и лизофосфатидилхолина (Schlemmer et al., 2005; Marí, Fernández-Checa, 2007; Tessari et al., 2009). В проведенном исследовании установлена данная тенденция, и, таким образом, изменение указанных биохимических показателей могут свидетельствовать о развитии патологических процессов на гистологическом уровне.

Таким образом, проведенный анализ липидного состава паразитов и зараженного органа характеризует взаимоотношения гельминтов *Triaenophorus nodulosus* и налима *Lota lota* (L.) как антагонистические. Плероцеркоиды для своего развития используют необходимые соединения из печени налима, нарушая при этом ее работу, что активизирует компенсаторную реакцию зараженного органа для нормализации функциональной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-01140-а, программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НИШ № 3731.2010.4 и Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России» на 2009–2011 гг.

Литература

Березанцев Ю. А. Формирование капсул вокруг личинок паразитических червей / Ю. А. Березанцев // Вопросы патологической анатомии. – 1973. – № 83. – С. 33–43.

Билич Г. Л. Биология. Полный курс: в 3 т. / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: ООО Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2002. – Т. 3. – 544 с.

Высоцкая Р. У. Сравнительная биохимия гельминтов рыб / Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров – Л.: «Наука», 1989. – 151 с.

Гурьянова С. Д. Липидный состав личиночной и взрослой форм некоторых цестод / С. Д. Гурьянова, В. И. Фрезе // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. – 1981. – С. 116–121.

Давыдов О. Н. Паразито-хозяйные отношения при цестодозах рыб / О. Н. Давыдов. – М.: Наука, 1991. – 240 с.

Давыдов В. Г. Иммунологические и биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина / В. Г. Давыдов, В. Р. Микряков. – Наука, 1998. – 152 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. – 304 с.

Комов В. П. Биохимия: Учеб. для вузов. / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран / Е. М. Крепс. – Л.: Наука, 1981. – 339с.

Лизенко Е. И. Экологическая биохимия липидов рыб / Е. И. Лизенко, О. М. Болгова. – Петрозаводск, 1987. – 324 с.

Мельянцева В. Г. Налим, его образ жизни и промысел / В. Г. Мельянцева. – Петрозаводск, 1986. – 52 с.

Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 215 с.

Пронина С. В. Изменение аргирофильной стромы печени некоторых рыб при инвазии плероцеркоидами *Triaenophorus nodulosus* и *Diphyllbothrium dendriticum* / С. В. Пронина // *Паразитология*. – 1988. – № 11. – С. 361–364.

Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб – липиды / В. С. Сидоров. – Л.: Наука, 1983. – 240 с.

Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. 1972. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тканевая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. / Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. // *Лососёвые (Salmonidae) Карелии*. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР. Вып. 1. С. 152–163.

Ackman R.G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids / R. G. Ackman // *Comp.Biochem.Physiol.* – 1997. – № 22. – P. 107–129.

Arduini A. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies / A. Arduini, A. Pescechera, S. Dottori // *J. Lipid Res.* – 1996. – V. 37. – № 2. – P. 684–689.

Barrett J. Forty years of helminth biochemistry / J. Barrett // – *Parasitology*. – 2009. – V. 136. – № 12. – P. 1633–42.

Brinker A. Evidence for negative impact of plerocercoid infection of *Triaenophorus nodulosus* on *Perca fluviatilis* L. stock in Upper Lake Constance / A. Brinker, R. Hamers // *Journal of Fish Biology*. – 2007. – V. 71. – № 1. – P. 129–147.

Colles S.M. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events / S.M. Colles, G.M. Chisolm // *Journal of Lipid Research*. – 2000. – V. 41. – P. 1188–1198.

Cowey C.B. Lipid nutrition in fish / C.B. Cowey, J.R. Sargent // *Comp.Biochem.Physiol.* – 1987. – № 57. – P. 269–273.

Engelbrecht F.M. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method / F.M. Engelbrecht, F. Mari, J.T. Anderson // *S.A. Med. J.* – 1974. – V. 48. – № 7. – P. 250–356.

Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle) / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloan-Syanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 226. – P. 497–509.

Gallo R.L. Lysophosphatidylcholine cell depolarization: Increased membrane permeability for use in the determination of cell membrane potentials / R.L. Gallo, R.P. Wersto, R.H. Notter, J.N. Finkelstein // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1984. – V. 235. – № 2. – P. 544–554.

Letherman T.B. Evidence for negative impact of plerocercoid infection of *Triaenophorus nodulosus* on *Perca fluviatilis* L. / T. B. Letherman // *The Journal of Fish Biology*. – 2007. – № 14. – P. 129–147.

Mari M. Sphingolipid signalling and liver diseases / M. Mari, J.C. Fernández-Checa // *Liver International*. – 2007. – V. 27. – № 4. – P. 440–450.

Mazumdar T. Influence of phospholipid composition on the adjuvanticity and protective efficacy of liposome-encapsulated *Leishmania donovani* antigens / T. Mazumdar, K. Anam, N. Ali // *Journal of Parasitology*. – 2005. – V. 91. – № 2. – P. 269–274.

Schlemmer H.-P.W. Hepatic phospholipids in alcoholic liver disease assessed by proton-decoupled 31P magnetic resonance spectroscopy / H.-P.W. Schlemmer, T. Sawatzki, S. Sammet, I. Dornacher, P. Bachert, G. Kaick, R. Waldherr, H.K. Seitz // *Journal of Hepatology*. – 2005. – V. 42. – № 5. – P. 752–759.

Swiderskia Z. Vitellocytes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle / Z. Swiderskia, W.E.R. Xylander // *International Journal for Parasitology*. – 2000. – V. 30. – № 7. – P. 805–817.

Tessari P. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease / P. Tessari, A. Coracina, A. Cosma, A. Tiengo // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 291–302.

Thomas J.D. The ecology of fish parasites with particular reference to helminth parasites and their salmonid fish hosts in Welsh rivers: a review of some of the central questions / J.D. Thomas // – *Adv. Parasitol.* – 2002. – V. 52. – № 1. – P. 1–154.

CHANGE OF LIPID COMPOSITION OF LIVERS BURBOT *LOTA LOTA* (L.) AT INVASION OF PLEROCERCOID *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

O.B. Vasiljeva, V.V. Lavrova, E.P. Ieshko, N.N. Nemova

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia, e-mail: vasil@krc.karelia.ru

Comparative analysis of burbot liver lipid composition with plerocercoid and capsule lipid composition denote qualitative identity and

quantitative differences of its. The degree of burbot lipid composition change depends on parasite invasion level.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОТХОДОВ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА СОСТОЯНИЕ МАССОВЫХ ВИДОВ РЫБ КОСТОМУКШСКОГО ХВОСТОХРАНИЛИЩА ПО АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Р. У. Высоцкая, С. А. Такшеев, В. С. Скидченко

Учреждение Российской академии наук

Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,

e-mail: rimma@bio.krc.karelia.ru

Введение

Реализация концепции устойчивого развития общества предполагает гармоничное сочетание интенсивной эксплуатации природных ресурсов с внедрением достижений технического прогресса и минимизации вреда, наносимого природе. Поверхностные воды суши среди природных объектов наиболее подвержены загрязнению, поскольку являются конечными коллекторами потока сточных вод и аэротехногенного загрязнения в региональном и глобальном масштабах (Моисеенко, 2009). Для своевременного выявления и прогнозирования развития негативных процессов, влияющих на качество вод, разработки и реализации мер по предотвращению этих процессов и оценки эффективности водоохраных мероприятий проводится мониторинг водных объектов. В Карелии одним из таких объектов, испытывающих значительную антропогенную нагрузку, является озерно-речная система Кенти – Кенто. Основным источником воздействия на водную систему р. Кенти являются техногенные воды Костомукшского горно-обогательного комбината по добыче и обогащению железорудного сырья (Лозовик и др., 2003). Верхнее озеро системы (оз. Костомукшское) преобразовано в хвостохранилище и используется для хранения отходов производства (хвостов обогащения) и оборотного водоснабжения предприятия. Особенностью техногенной воды хвостохранилища является высокая минерализация (с преобладанием ионов калия, сульфатов и гидрокарбонатов), аномальное соотношение щелочных и щелочноземельных катионов, щелочная среда и наличие мелкодисперсной взвеси. Из микроэлементов повышенное количество по сравнению с фоновыми значениями отмечается

для лития. В начальный период наблюдений содержание тяжелых металлов (Zn, Cu, Ni, Pb, Co, Cd, Cr) в воде хвостохранилища не превышало предельно допустимых уровней для рыбохозяйственных водоемов (Дубровина и др., 1995; Калинин и др., 2003; Такшеев, 2005). Такое преобразование слабоминерализованных гидрокарбонатно-кальциевых вод в сульфатно-калиевые повышенной минерализации вызвало существенные изменения состояния биоты озера Костомукшского и других нижележащих водоемов системы реки Кенти.

Особое значение для оценки трансформации водных экосистем имеют исследования на рыбах, часто являющихся конечным звеном в трофической цепи, в котором накапливаются и находят отражение изменения на предыдущих уровнях. При проведении работ, связанных с биомониторингом и тестированием водоемов в настоящее время наряду с традиционными биологическими и гидрохимическими методами всё более широко применяются молекулярно-генетические и физиолого-биохимические методы (Сидоров и др., 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Мещерякова и др., 2010). Привлечение широкого комплекса биохимических показателей позволяет выявить механизмы воздействия поллютантов на определенные звенья метаболизма, провести раннюю диагностику токсикозов, определить основные загрязнители и степень их токсичности для гидробионтов.

При изучении влияния промышленных поллютантов органической и неорганической природы на гидробионтов было показано, что в защитных и приспособительных реакциях водных организмов на уровне клетки значительную роль играют лизосомальные, микросомальные и другие ферментные системы (Немова, Высоцкая, 2004; Такшеев, 2005; Морозов и др., 2007; Вы-

соцкая, Немова, 2008; Versteeg, Giesy, 1985; Köhler, 1991; Baba et al., 1997).

Целью исследования было сравнительное изучение активности лизосомальных ферментов у массовых видов рыб из Костомукшского хвостохранилища и из чистого, не подвергающегося загрязнению озера Каменного. Биохимические исследования рыб из района Костомукши проводились нами, начиная с 1993 года. Данная работа продолжает этот ряд наблюдений и выполняется для оценки современного состояния рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и сопоставления с результатами, полученными ранее.

Материал и методы исследования

Объектами исследования являлись самцы и самки щуки *Esox lucius* и сига *Coregonus lavaretus* из Костомукшского хвостохранилища и из оз. Каменного.

Сведения, полученные при проведении мониторинга озерно-речной системы реки Кенти, свидетельствуют о неблагоприятных изменениях химического состава воды под воздействием отходов комбината. В хвостохранилище к 2009 году по сравнению с 2000 годом возросла общая минерализация с 500 мг/л до 645 мг/л, концентрация ионов K^+ со 130 мг/л до 156 мг/л, сульфатов со 114 мг/л до 172 мг/л, в то же время концентрация гидрокарбонатов снизилась со 146 мг/л до 122 мг/л. Кроме того, к настоящему времени наряду с минеральным калийно-сульфатным загрязнением встал вопрос о загрязнении озерно-речной системы и хвостохранилища нитратами. Вместе с изменениями химического состава воды происходит перестройка в структуре фито- и зоопланктонных ценозов. Численность и биомасса фито- и зоопланктона снизилась в десятки раз, произошла перестройка видового состава. Типичные обитатели северных водоемов оказались менее устойчивыми к воздействию данного минерального загрязнения, в связи с чем произошло их вымирание. В верхних водоемах и в хвостохранилище фито- и зоопланктон представлен немногими эврибионтными видами (Состояние водных объектов ..., 2007). Проведенные в 1995 г. и в 2001 г. исследования ихтиофауны хвостохранилища показали её крайне бедный состав. Массовыми были только два вида: плотва и щука (Такшеев, 2005). В уловах 2009 г. в хвостохранилище были отмечены четыре вида рыб: плотва, щука, сиг, уклейка.

В соответствии с программой мониторинга поверхностных водных объектов проведены ис-

следования расположенных в районе Костомукши незагрязняемых озёр. Одним из таких фоновых объектов считается оз. Каменное, расположенное на территории государственного заповедника «Костомукшский». Из этого водоема были взяты контрольные образцы рыб. Озеро сохраняет статус чистого водоема с высоким качеством воды. Химические показатели в северной части этого водоема были следующими: общая минерализация – 11,3 мг/л, pH 6,5–6,7, содержание O_2 – 60–80%, цветность – 25 град., Feобщ – 0,08 мг/л, Робщ – 8 мкг/л, Noбщ – 0,30 мг/л. По видовому составу и количественному развитию фито- и зоопланктона оз. Каменное можно охарактеризовать как олиготрофный водоем (Состояние водных объектов ..., 2007). Рыбное население оз. Каменного представлено следующими видами: озерный лосось, ряпушка, сиг, щука, окунь, плотва, язь, голяк, ерш, налим, колюшка девятиглая, подкаменщик. В уловах 2009 г. были отмечены семь видов (окунь, сиг, плотва, щука, уклейка, хариус, ряпушка).

Взятые для исследований рыбы имели следующие характеристики. Самцы щук из хвостохранилища были второй стадии зрелости гонад, возраста от 3-х до 7 лет; самки – второй и шестой стадии зрелости гонад, возраста 5–8 лет.

Щуки из оз. Каменного также были представлены самцами второй стадии зрелости гонад, возраста – 5–9 лет; самки щук имели вторую и шестую стадии зрелости и возраст – 6–9 лет.

Как сказано выше, в предыдущий период исследований (1993–1995 гг. и в 2000 г.) в хвостохранилище сиг не отлавливался, поэтому исследования проводили на щуке и плотве. В уловах 2009 г. появился сиг. Для исследований были взяты самцы сига второй-третьей стадии зрелости в возрасте 3–4 года и самки третьей стадии зрелости гонад.

Из оз. Каменного самцы сегов были взяты второй стадии зрелости 2-х возрастных групп: 2–4 года и 6 лет; самки – второй-третьей стадии зрелости гонад, возраст – 3 года.

Активность ферментов определяли в печени, почках, жабрах, мышцах и гонадах исследованных рыб. Гомогенаты, приготовленные на 0,25 М растворе сахарозы с добавлением ЭДТА и неионного детергента тритона X-100, подвергали центрифугированию при 10 000 g на центрифуге с охлаждением. В надосадочной жидкости определяли активность ферментов (кислой фосфатазы, ДНКазы, РНКазы, β -глюкозидазы, β -галактозидазы) и содержание белка по методам, приведенным в наших работах (Высоцкая, Немова, 2008).

Расчет активности ферментов производили на 1 сырого веса ткани в минуту и на 1 мг белка. Полученные результаты обрабатывали общепринятыми статистическими методами, оценивая достоверность отличий по критерию U Вилкоксона – Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали различную реакцию на техногенные воды хвостохранилища как у представителей разных видов, так и у самцов и самок одного вида. У самцов щуки из хвостохранилища наблюдалось снижение активности кислой фосфатазы во всех органах кроме печени, особенно значительно в жабрах и почках. Угнеталась активность РНКазы в жабрах, гонадах и мышцах (рис. 1).

У самок второй стадии зрелости активность кислой фосфатазы немного возрастала в почках и жабрах. РНКаза повышалась в жабрах самок второй и шестой стадии зрелости. У тех и других на

более высоком уровне была активность ДНКазы во всех органах (рис. 2).

Очень интересным, на наш взгляд, является характер изменения активности гликозидаз. Во всех сравниваемых группах рыб активность β -глюкозидазы у щук из хвостохранилища была ниже, а β -галактозидазы – намного выше по сравнению со щуками из оз. Каменного. Эта закономерность сохранялась и при расчете удельной активности фермента (рис. 3).

Содержание белка было повышенным в органах самок щуки в хвостохранилище, причем на большую величину у самок второй стадии зрелости гонад.

Другой характер имели изменения изученных биохимических показателей под влиянием техногенной воды хвостохранилища у сига. Так, содержание белка во всех органах самцов повышалось, а у самок заметно возрастало только в гонадах (рис. 4).

Активность кислой фосфатазы у самок сига изменялась незначительно, у самцов уровень этого фермента заметно повышался в почках (рис. 5).

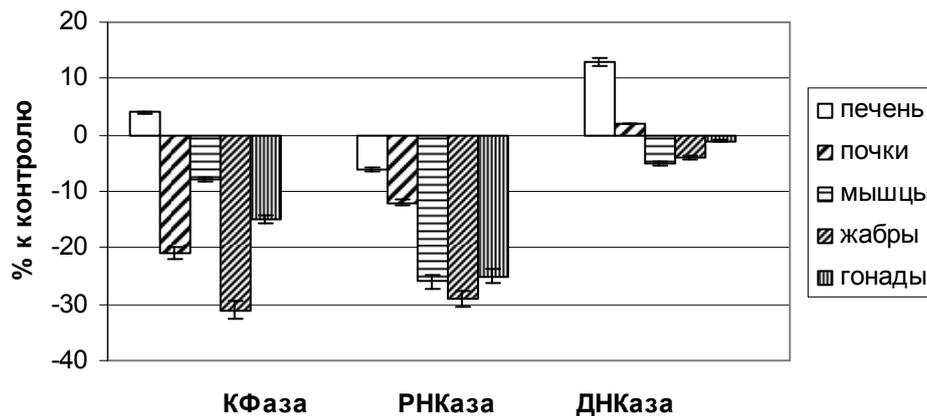


Рис. 1. Активность лизосомальных ферментов в органах самцов щуки (второй стадии зрелости гонад) из Костомукшского хвостохранилища

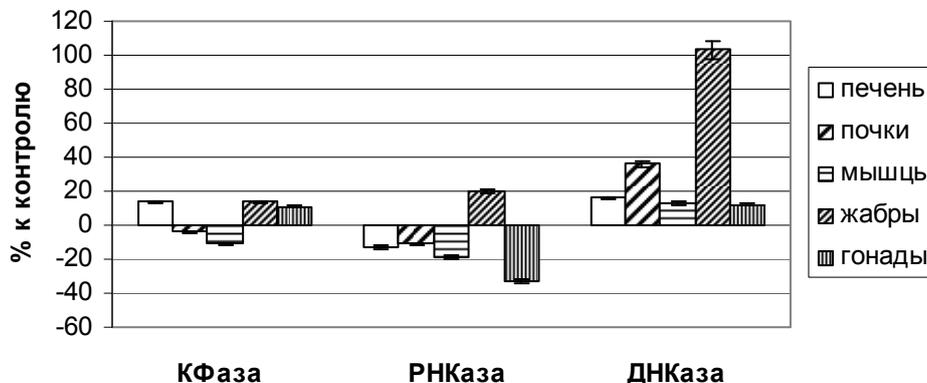


Рис. 2. Активность ферментов в органах самок щуки (шестой стадии зрелости гонад) из Костомукшского хвостохранилища



Рис. 3. Активность гликозидаз в органах самок щуки (второй стадии зрелости гонад) из Костомукшского хвостохранилища

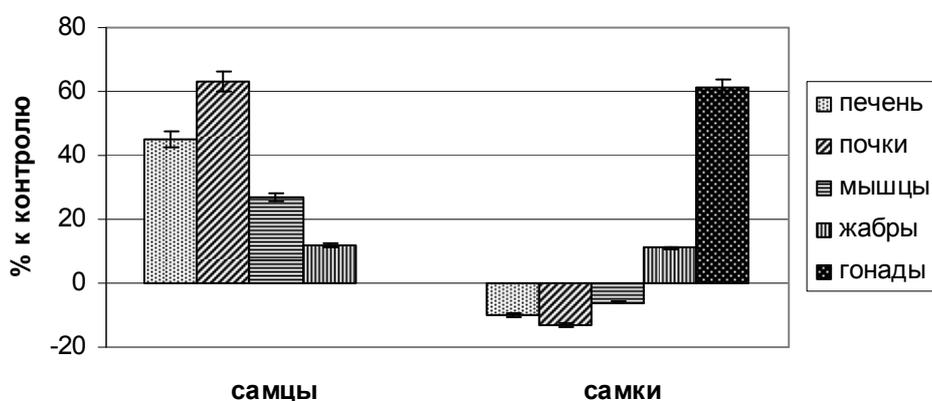


Рис. 4. Сравнительное содержание белка в органах сига из Костомукшского хвостохранилища и оз. Каменного (контроль)

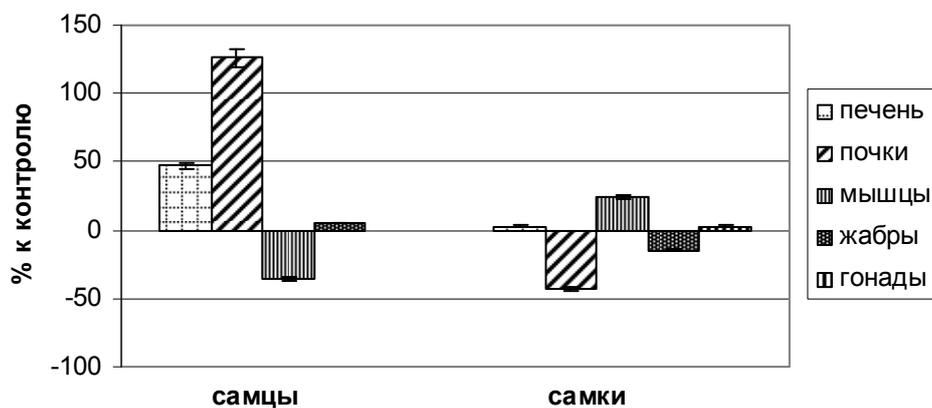


Рис. 5. Активность кислой фосфатазы в органах сига из Костомукшского хвостохранилища

Уровень активности β -глюкозидазы у самцов сига в большинстве органов (печень, почки, мышцы) возрастала, а у самок (за исключением мышц) – угнеталась.

Активность β -галактозидазы практически во всех органах сига из хвостохранилища так-

же была на более низком уровне по сравнению с сигами из контрольного водоема (рис. 6). Следует указать, что лишь в жабрах самцов отмечен более высокий уровень этого фермента.

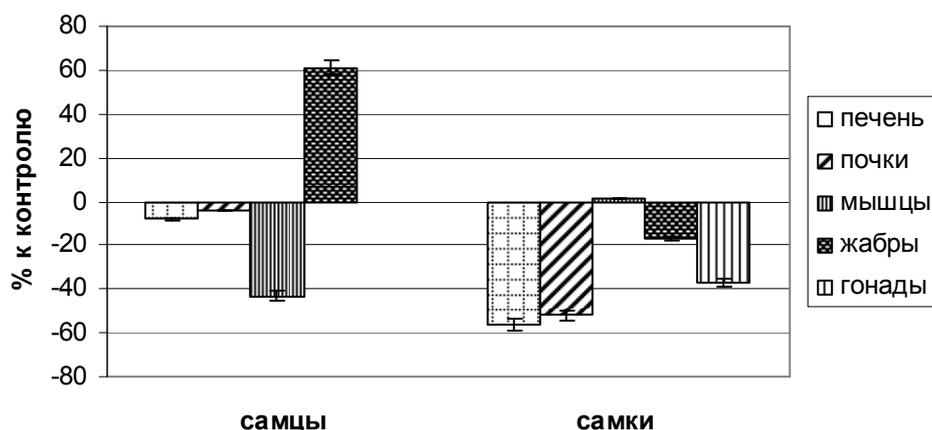


Рис. 6. Активность β -галактозидазы в органах сига из Костомукшского хвостохранилища

Анализ полученных результатов свидетельствует о существенных различиях в адаптивных реакциях рыб к наличию в среде обитания одного и того же загрязнения. У самцов щуки эта реакция проявляется в угнетении большинства ферментов, а у самок отмечается повышение тех же ферментов в таких органах как почки и жабры. Интересно, что в исследованиях прошлых лет биохимическая адаптация щук к данному типу загрязнения проявлялась в активации большинства лизосомальных гидролаз (Такшеев, 2005). Различия между самками второй и шестой стадии зрелости гонад не столь велики. Они характеризуются размахом амплитуды исследованных биохимических показателей, которая больше у самок второй стадии зрелости. Возможной причиной этого является отличающийся гормональный фон у самок двух изученных групп щуки.

Ранее при исследовании влияния отходов металлургических комбинатов на разные виды рыб был установлен высокий адаптивный потенциал щук (Высоцкая и др., 2006). В данной работе выявлено резкое возрастание активности β -галактозидазы во всех органах щук, и особенно значительное в жабрах и гонадах. Это может указывать на вовлечение в адаптивные реакции щуки галактозсодержащих липидов и протеогликанов.

Отличающаяся от ранее установленной реакция со стороны гликозидаз и других лизосомальных ферментов щуки на минеральное загрязнение, вероятно, связана с изменениями в химическом составе хвостохранилища (увеличение общей минерализации, сдвиг pH в менее щелочную область), сказывающимися, в свою очередь, на количественных и качественных показателях кормовой базы рыб. Кроме того, на

формирование адаптивного потенциала щуки накладывает отпечаток многолетнее пребывание щуки в сложившихся неблагоприятных условиях. Постепенно накапливающиеся небольшие изменения передаются в ряду поколений, происходит стабилизация адаптивного потенциала на более высоком уровне.

У сига также наблюдались различия в реакции на минеральное загрязнение между самцами и самками. Наибольший вклад в процессы адаптации к техногенной среде хвостохранилища у самцов вносили печень и почки. У самок наиболее значительным было повышение активности гликозидаз в мышцах и гонадах. Еще одним отличительным моментом, характеризующим видовые особенности реагирования на минеральное загрязнение среды, является отсутствие повышенного активирования галактозидазы в органах сига, которое было выявлено у щук во всех сравниваемых группах.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить ряд отличий в адаптивных реакциях рыб к хроническому загрязнению водоема отходами горно-обогатительного комбината по сравнению с предыдущим периодом. Эти отличия определяются произошедшими изменениями в химическом составе техногенной воды хвостохранилища и структурными преобразованиями в сообществах фито- и зоопланктона. Показана видовая и половая специфичность адаптивных реакций на уровне лизосомальных гидролаз.

Работа выполнена при поддержке Программы Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» НШ-3731.2010.4, программ ОБН РАН «Биоресурсы 2009–2011» и Президиума РАН «Биоразнообразие 2009–2011».

Литература

- Высоцкая Р. У., Немова Н. Н., 2008. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб / Ред. А. С. Коничев, М.: Наука. 284 с.
- Высоцкая Р. У., Такшеев С. А., Немова Н. Н., Амелина В. С., Морозов Д. Н., 2006. О видоспецифичности биохимических реакций рыб на разные типы антропогенного воздействия // Северная Европа в XXI веке: Природа, культура, экономика. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 75–78.
- Дубровина Л. В., Калинин Н. М., Лозовик П. А., 1995. Факторы токсичности для гидробионтов техногенных вод Костомукшского ГОКа // Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 15–25.
- Калинкина Н. М., Кухарев В. И., Морозов А. К., Рябинкин А. В., Власова Л. И., 2003. Критические уровни минерального загрязнения экосистемы р. Кенти // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 103–110.
- Лозовик П. А., Куликова Т. П., Мартынова Н. Н., 2003. Мониторинг водных объектов республики Карелия в 1992–2000 гг. // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 135–144.
- Мещерякова О. В., Чурова М. В., Немова Н. Н., 2010. Изменение активности некоторых митохондриальных ферментов органов рыб при антропогенной нагрузке // современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы III междунар. конф. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. С. 116–117.
- Моисеенко Т. И., 2009. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты. М.: Наука. 400 с.
- Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У., Немова Н. Н., Кашулин Н. А., 2007. Активность цитохрома P-450 у сига *Coregonus lavaretus* и щуки *Esox lucius* из водоемов Субарктики при воздействии сточных вод горно-перерабатывающих предприятий // Вопросы ихтиологии. Т. 47, № 1. С. 101–106.
- Немова Н. Н., Высоцкая Р. У., 2004. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука. 216 с.
- Сидоров В. С., Немова Н. Н., Высоцкая Р. У., Такшеев С. А., 2003. Вариабельность интегрального биохимического индекса у рыб под влиянием техногенных вод горно-обогатительного комбината // Экология. № 4. С. 274–280.
- Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг., 2007. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. 210 с.
- Такшеев С. А., 2005. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН. 23 с.
- Baba M., Osumi M., Scott S.V., Klionsky D.J., Osumi Y., 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/ lysosome // J. Cell. Biol. V. 139, no. 7. P. 1687–1695.
- Köhler A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators of toxic effects of environmental pollution // Compar. Biochem. and Physiol. C. V. 100, no. 1–2. P. 123–127.
- Versteeg D.J., Giesy J.P., 1985. Lysosomal enzyme release in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirochirus* Rafinesque) exposed to cadmium // Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 14. P. 631–640.

ESTIMATION OF THE ORE-MINING INDUSTRY WASTES EFFECT ON THE MASS FISH SPECIES OF THE KOSTOMUKSHSKOE RESERVOIR USING LYSOSOMAL ENZYMES ACTIVITY ASSAY

R.U. Vysotskaya, S.A. Taksheev, V.S. Skidchenko

*Institute of biology Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: rimma@bio.krc.karelia.ru*

A comparative study of lysosomal enzymes activity was undertaken in different tissues of whitefish and pike from the Kostomukshskoe reservoir, polluted by ore-mining industry wastes, and from the pure lake Kamennoe. Species, age and sex specificity were discovered in adaptive reactions of fish to mineral pollution of this type. The results obtained differed from the data of the previous ones, probably, because of the ongoing

changes in chemical composition of technogenic waste waters (increasing total mineralization, decreasing pH) and concomitant alteration of phyto- and zooplankton. Besides of this, temporary distinction in biochemical responses of whitefish and pike to the pollution could be explained by stabilizing of adaptive reactions due to prolonged living in the anthropologically changed environment.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТИХООКЕАНСКИХ ЛОСОСЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ ГОНАД СОЗРЕВАЮЩИХ ОСОБЕЙ В ПЕРИОД ВЕСЕННЕ-ЛЕТНЕГО НАГУЛА И АНАДРОМНОЙ МИГРАЦИЙ В 2000 И 2007 гг.

С. Б. Городовская, В. И. Шершнева

Камчатский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,
г. Петропавловск-Камчатский, Россия,
e-mail: gorodovskaya.s.b@kamniro.ru

Введение

Для рыбохозяйственной науки на современном этапе в популяционных исследованиях биологии тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus* представляет практический интерес решение вопросов распределения, биологического состояния особей и динамики вылова в морских промысловых скоплениях. В течении морского дрефтерного промысла в 2000 года выяснялись характерные черты гаметогенеза и особенности биохимического состояния созревающих лососей. Были получены первые данные, характеризующие содержания химических веществ в гонадах и мышцах самцов и самок горбуши, созревающих самок и самцов кеты и нерки разного возраста в период нагульной и преднерестовой миграции. Исследования проводились в северо-западной части Тихого океана (СЗТО).

В весенне-летний период в прикамчатских водах северо-западной части Тихого океана нагуливаются все виды дальневосточных лососей. Созревающие лососи отдельных стад мигрируют на нерест к рекам восточной и северо-восточной Камчатки (Бугаев, 1995; Заварина, 2004). В этот период лососи продолжают активно питаться (Карпенко и др., 2006) и в их организме депонируются высокоэнергетические вещества, за счет которых развиваются половые железы (Лав, 1976). Одним из наиболее важных показателей, отражающим влияние абиотических и биотических условий нагула на интенсивность обменных процессов в организме рыб, является уровень их жиронакопления (Шершнева, 1968; Кизеветтер, 1973; Лав, 1976).

Цель исследований – оценка физиологического состояния созревающих лососей на основании гистологических и биохимических показателей гонад и мышц горбуши, кеты и нерки.

Материалы и методы

В работе использованы результаты химического и гистологического анализа гонад от одних и тех же особей лососей, отловленных в период весенне-летних миграций. Материалы собраны в ходе научно-исследовательских экспедиций на российских дрефтерных судах в мае-августе 2000–2007 гг. в Петропавловск-Командорской подзоне (координаты: 51°21'–54°00' с.ш., к востоку от побережья восточной Камчатки до 167°11' в.д.). Сбор и обработка проб проводились стандартными методами (Лав, 1976; Shershneva, 1991; Волкова, Елецкий, 1982). При изучении гистологических препаратов самок кеты и нерки под микроскопом Olympus просчитывались ооциты разных стадий развития. Изучено 2324 препарата. Химическому анализу были подвергнуты гонады и мышцы лососей, собранные в 2000–2007 гг., всего 1942 экз. (табл. 1). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ EXCEL, STATISTICA 6,0, OPTIMAS 6. Расчет коэффициентов корреляции и оценку их достоверности проводили непосредственно по значениям сопряженных признаков, т.е. без группировки выборочных данных в вариационные ряды (при $P > 0,99$). Изменчивость показателей оценивали по коэффициенту вариации (CV, %). Достоверность различий определяли стандартным методом, а уровень надежности определяемых пара-

Таблица 1. Объем обработанного материала (экз. лососей)

Методика	Вид	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	всего
Гистология (экз.)	нерка	36	76	55	125	106	79	53	18	548
	кета	49	54	48	143	56	81	66	15	512
	горбуша	9	10	10	21	12	15	17	10	104
Биохимия (экз.)	нерка	53	170	80	112	135	160	64	36	810
	кета	104	181	71	181	79	133	61	60	870
	горбуша	19	51	40	40	19	18	17	58	262

метров оценивали при $p > 0,01$. Ошибка не превышала 5%.

Изображение гистологических срезов получены с помощью комплекса, в состав которого входит видеокамера Leika DC и микроскоп Olympus. Фотографии обработаны в программе OPTIMAS 6.5.

Результаты и обсуждение

Характеристика биологического состояния горбуши в период анадромных миграций

Жир – наиболее лабильный компонент химического состава тканей и изменение его содержания связано с глубокими биохимическими процессами, происходящими в организме рыб, в зависимости от их биологического состояния. Жир, депонирующийся в мышцах, печени или на других внутренностях является тем резервом, из которого черпается энергия для дозревания гонад в преднерестовый период (Анохина, 1969; Шатуновский, 1980).

В весенне-летний период 2000–2007 гг. в прикамчатских водах СЗТО нагуливались малочисленные поколения восточно-камчатская горбуши (в четные годы), численность которых изменялась от 2,42 млн. экз. (2000 г.) до 34,0 млн. экз. (2006 г.) и урожайные поколения (нечетные годы) – численность которых изменялась от 47,7 млн. экз. (2001 г.) до 105,0 млн. экз. (2007 г.).

В июле в клетках гонад самок завершается формирование структурных элементов, но продолжается интенсивное накопление трофиче-

ских включений. Все анализируемые гонады горбуши имеют созревающие ооциты и сперматозоиты. В начале анадромных миграций в яичниках горбуши присутствуют ооциты, в которых ампулы жира и глыбки желтка обнаруживаются по всей площади ооплазмы (рис. 1). В июне не были обнаружены более ранние стадии развития ооцитов, которые характеризуются процессом вакуолизации плазмы по периферии ооцитов. В течение июня в яичниках горбуши происходит интенсивное накопление трофических включений. К концу июня – началу июля ооциты находились на завершающем периоде вителлогенеза – накопления жира и желтка по всей ооплазме.

Жирность гонад самок увеличивалась до 12,6% у самок горбуши урожайного поколения в 2003 г. (численность 101,0 млн. экз.), а минимальная жирность в гонадах самок циклического поколения – 7,8% (численность 95,0 млн. экз.) в 2005 г., в отличие от жирности в мышцах (рис. 2). Содержание жира в гонадах самок горбуши малочисленных поколений варьировала от 8,73% в 2004 г. (численность 22,6 млн. экз.) до 10,65% в 2002 г. (численность 4,0 млн. экз.).

Перераспределение энергетических веществ в организме созревающих самок в период анадромных миграций показывает процесс ускоренного созревания гонад, для которого требуется накопление значительного количества жира в гонадах и поэтому калорийность гонад выше калорийности мышц самок (рис. 3).

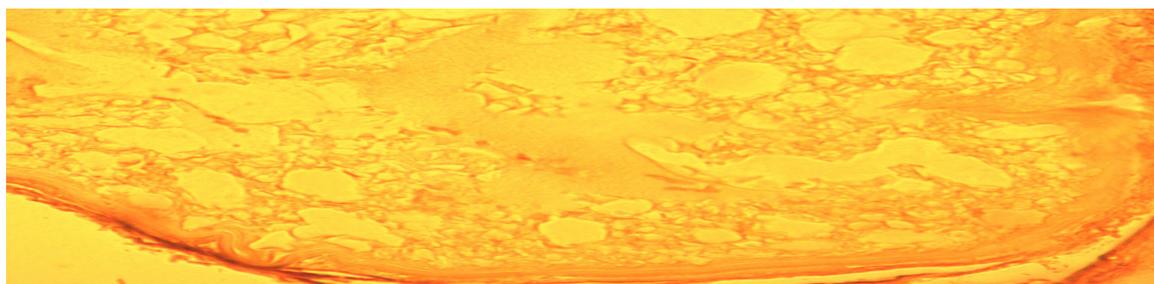


Рис. 1. Срез вителлогенного ооцита горбуши. Стадия вакуолизации всей ооплазмы. Ув.: 20X10

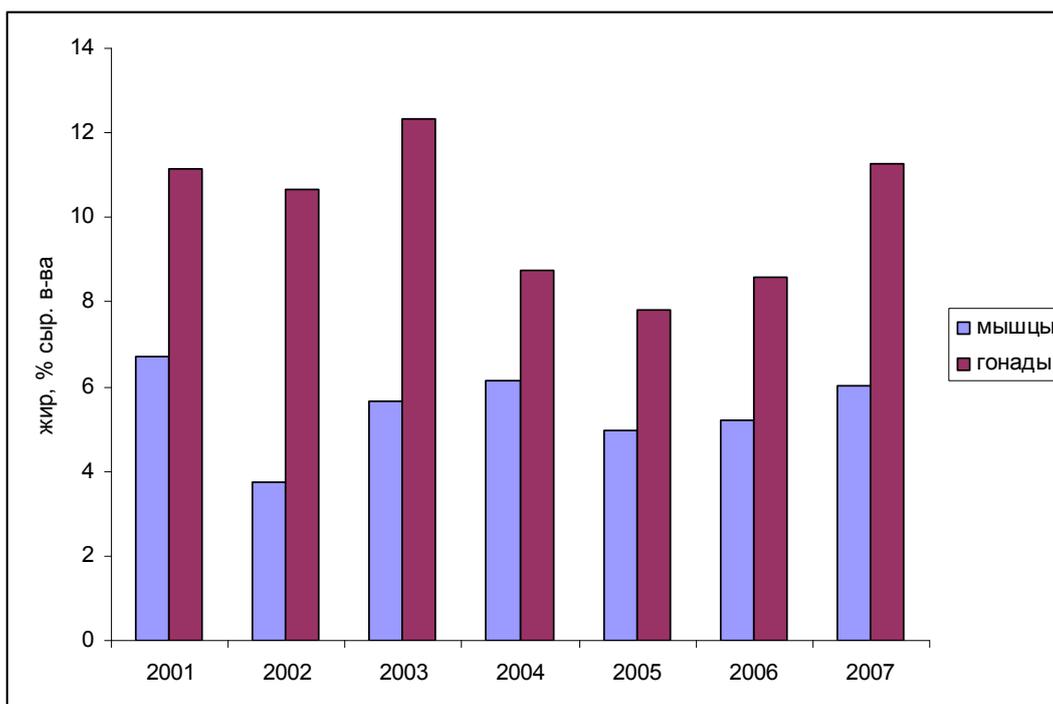


Рис. 2. Содержание жира (% сыр. в-ва) в мышцах и гонадах самок горбуши (июль 2001–2007 гг.)

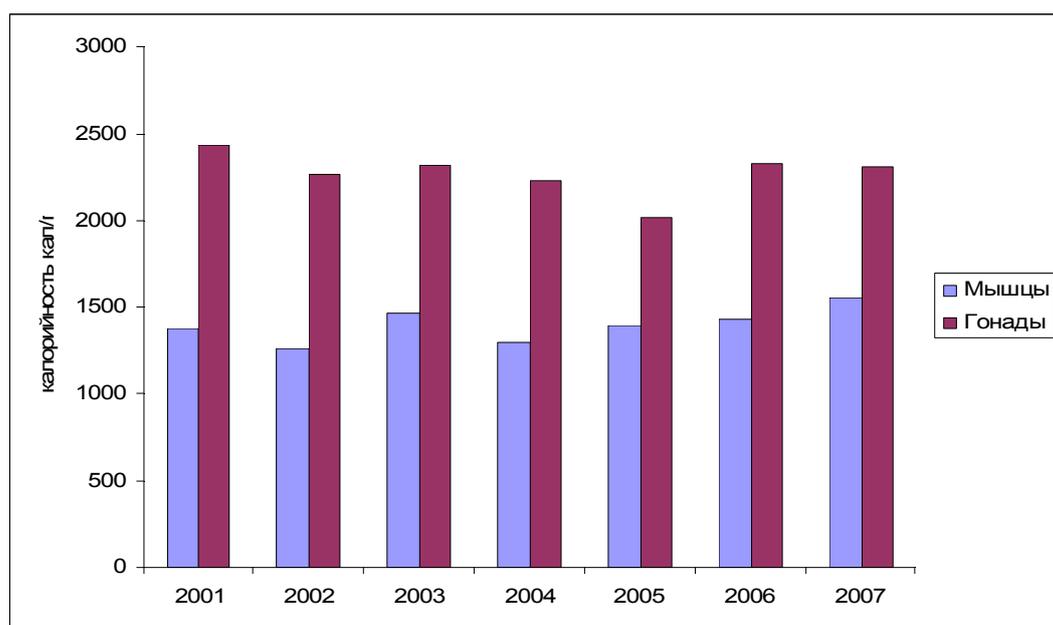


Рис. 3. Калорийность (ккал/г) гонад и мышц самок горбуши в июле 2001–2007 гг.

Исследования семенников горбуши выловленных на ранних этапах анадромных миграций разных лет показали, что процесс активного сперматогенеза подходил к завершающей фазе (рис. 4) т.е. в семенниках присутствовали сперматоциты разных порядков. Деление сперматогоний полностью закончилось и сперматоциты 1-го и 2-го порядков образовывали значительные скопления, а

также начиналось формирование сперматид. В начале июля состояние половых клеток гонад самцов не изменялось, увеличилась лишь их масса. В июле масса гонад самцов горбуши урожайных поколений изменялась от 79,6 г (ГСИ – 6,91) в 2001 г. до 95,5 г (ГСИ – 6,78) в 2003 г. Масса гонад самцов горбуши малочисленных поколений не превышала 82,1 г (ГСИ – 6,27) в 2002 г.

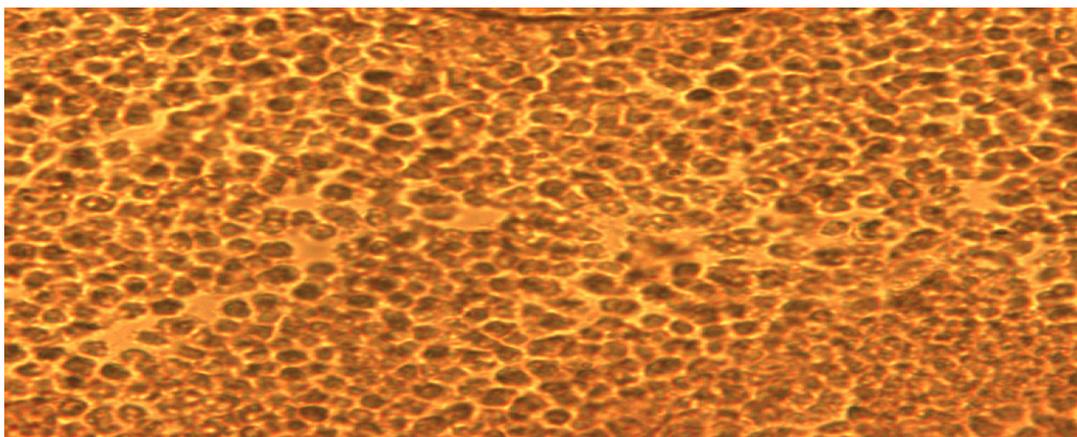


Рис. 4. Срез семенника горбуши. Семенник заполнен сперматоцитами разных порядков. Ув.: 20X100

Содержание воды в семенниках горбуши во все годы исследований находилась на высоком уровне и колебалась от 82,9 до 87,1%, в отличие от содержания воды в мышцах (рис. 5), жирность семенников всегда была незначительна – не более 2,0%, общая калорийность гонад — невысокой и изменялась от 483 до 1035 кал/г.

Увеличение содержания воды в семенниках созревающих самцов объясняется тем, что вода, необходима для подвижности спермиев, поэтому общая калорийность семенников была невысокой.

В июле процесс созревания половых желез горбуши заканчивается. Но особи продолжают активно питаться (Карпенко и др., 2006) и энергия, поступающая с пищей в их организм depo-

нируется в виде жировых резервов. В этот период энергии на формирование половых клеток уже не требуется, только небольшое ее количество необходимо на увеличение запасов липидных отложений в ооцитах и энергетических затрат на рост массы семенников (Городовская, Шершнева, 2010), поэтому жировые отложения продолжают увеличиваться в мышцах горбуши (рис. 6) Процессы жиронакопления в мышцах и гонадах самок и самцов горбуши протекают синхронно. Горбуша заходит в реки с уже вполне созревшими гонадами, готовыми к вымету икры и молок, в то время, как дозревания половых желез у нерки и кеты продолжается в пресной воде (Бирман, 1985; Лав, 1976; Idler, Bitners, 1976).

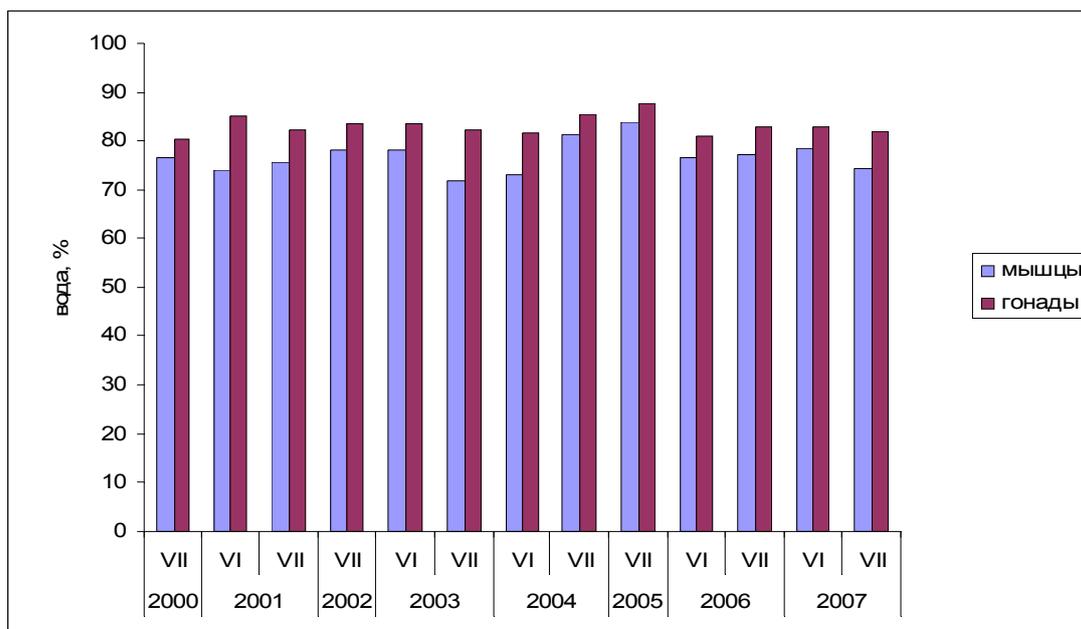


Рис. 5. Количества воды (% сыр. в-ва) в мышцах и гонадах самцов горбуши (июнь-июль 2000–2007 гг.)

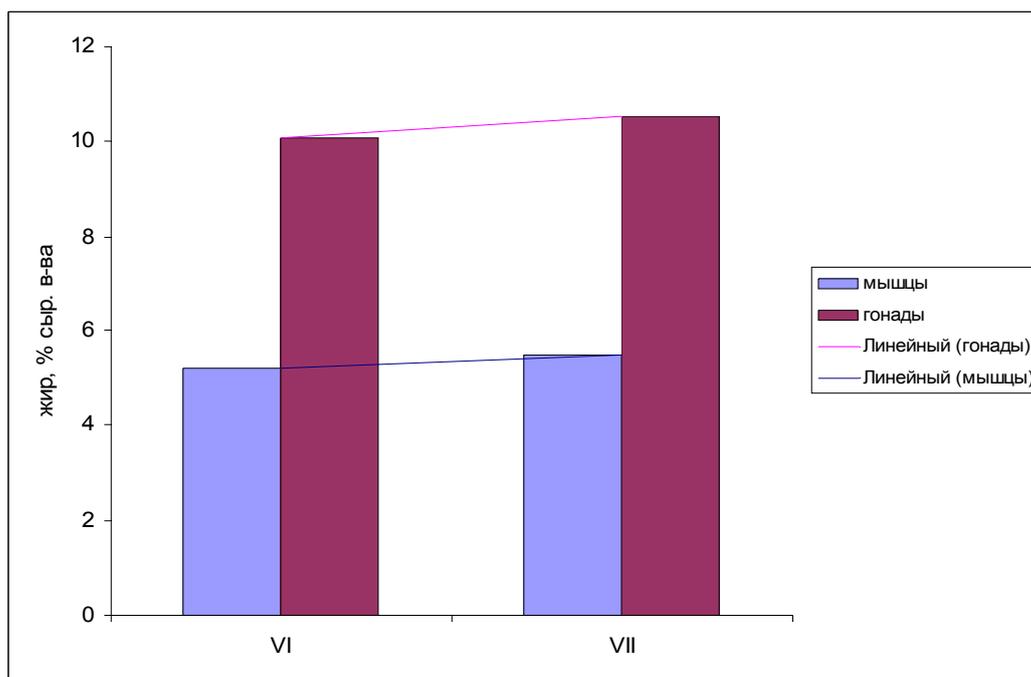


Рис. 6. Внутри сезонная динамика содержания жира (% сыр. в-ва) в яичниках и мышцах горбуши (2000–2007 гг.)

Характеристика биологического состояния созревающей кеты и нерки

Кета. Скоплений кеты, нагуливавшейся в прикамчатских водах СЗТО в весенне-летний период 2000–2007 гг. составляли особи всех возрастов. В июне масса гонад половозрелых самок кеты составляла от 78 г (ГСИ – 3,60) до 80 г (ГСИ – 4,00). В июле масса гонад значительно увеличилась: до 197 г (ГСИ – 7,67). Наибольшая масса гонад была у созревающих самок в возрасте 5+ и составила 300 г (ГСИ – 13,64). Корреляция между массой гонад и гонадосоматическим индексом созревающих самок кеты была положительной ($r \pm m = +0,99 \pm 0,03$).

Основное количество ооцитов в яичниках созревающих самок кеты уже вступило в период

большого роста. Характерной особенностью этого периода развития является интенсивный процесс накопления трофических включений в виде жира и желтка в центральной (околоядерной) зоне плазмы ооцитов (рис. 7).

Общая энергия, аккумулированная в мышцах созревающих самок кеты, по мере нагула постепенно перераспределяется в гонады самок, где содержание жира возрастает, а в мышцах соответственно, снижается, в среднем от 8,9% в мае до 6,5% в августе. У созревающих самок отмечено увеличение жирности гонад в среднем от 3,7% в мае до 16,1 в августе (рис. 8) и калорийности от 1930 до 2461 кал/г, соответственно. Процесс сопровождался уменьшением количества жира в мышцах, значит и калорийности (рис. 9).

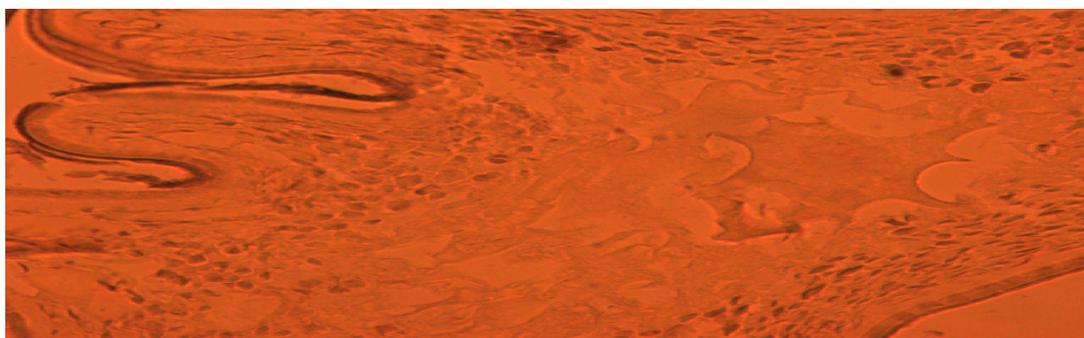


Рис. 7. Срез яичника кеты. Ооцит содержит жировые капли в околоядерной зоне оплазмы. Ядро имеет фестончатые края (июль 2007 г). Ув.: 20X40

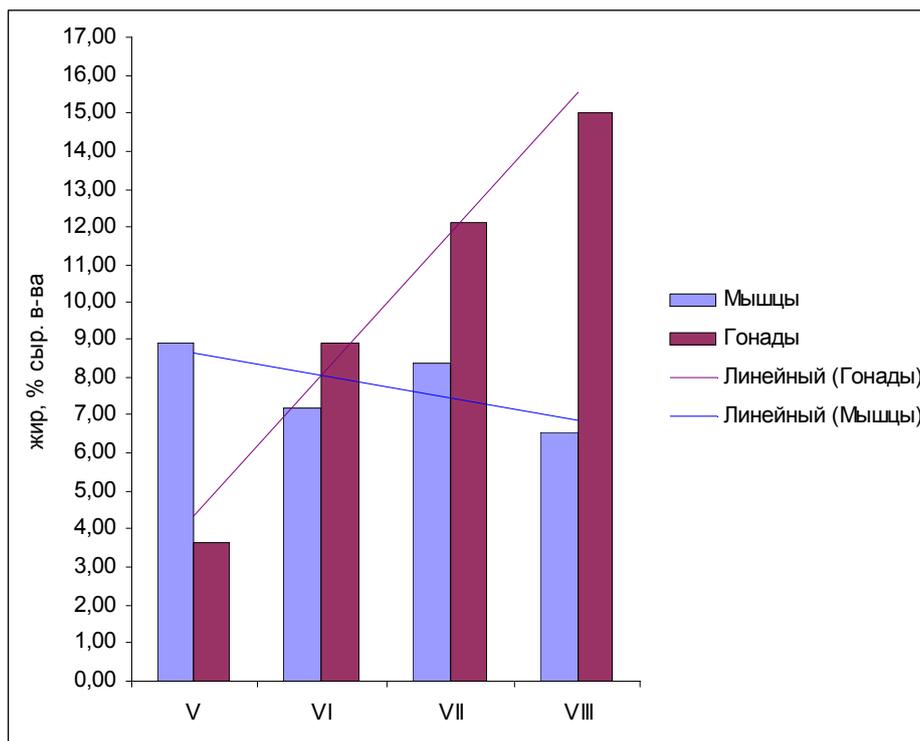


Рис. 8. Внутри сезонная динамика содержания жира (% от сыр. в-ва) в яичниках и мышцах самок созревающей кеты (2000–2007 гг.)

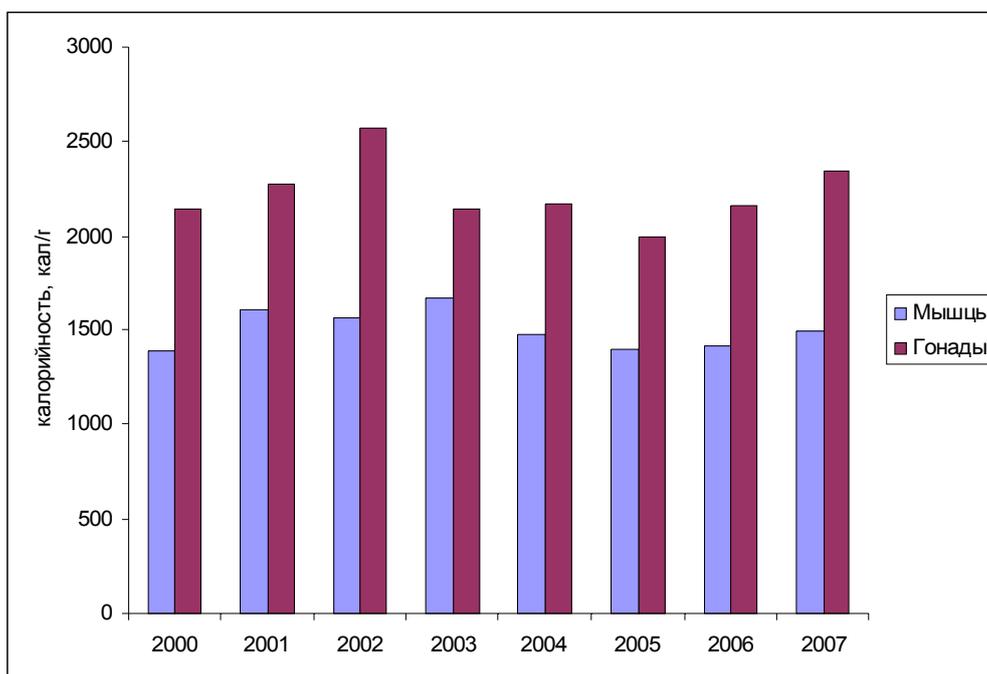


Рис. 9. Калорийность (кал./г) гонад и мышц созревающих самок кеты в 2000–2007 гг

Созревающие самки кеты характеризовались увеличением содержания жира в яичниках и повышенной калорийностью. По мере приближения анадромных миграций особи лососей аккумулировали в мышцах значительное количество

резервной энергии в виде жировых накоплений. Энергия, накопленная в мышцах в период нагула, расходуется не только для поддержания обменных процессов в организме на определенном уровне, но и для дальнейшего развития клеток

половых желез и эмбрионов. Созревание лососей сопровождается значительным истощением жировых резервов в мышцах. Перераспределение энергетических веществ из мышц в яичники кеты происходит постепенно – от начала анадромной миграции (май, июнь) к завершающим месяцам (июль, август), т.е. при приближении к местам нереста (рис. 8).

Созревающие самцы кеты были всех возрастов. В июле масса гонад самцов колебалась от

71 г (ГСИ – 2,68) до 157 г (ГСИ – 4,23). В половых клетках таких самцов происходил процесс активного сперматогенеза. Основную массу половых клеток составляли сперматозоиды разных порядков (рис. 10). Между массой гонад самцов и их гонадосоматическим индексом, существует тесная связь ($r \pm m = + 0,98 \pm 0,03$). В гонадах созревающих самцов увеличилось содержание воды (рис. 11). Жирность гонад созревающих самцов повысилась незначительно до 2,6%.

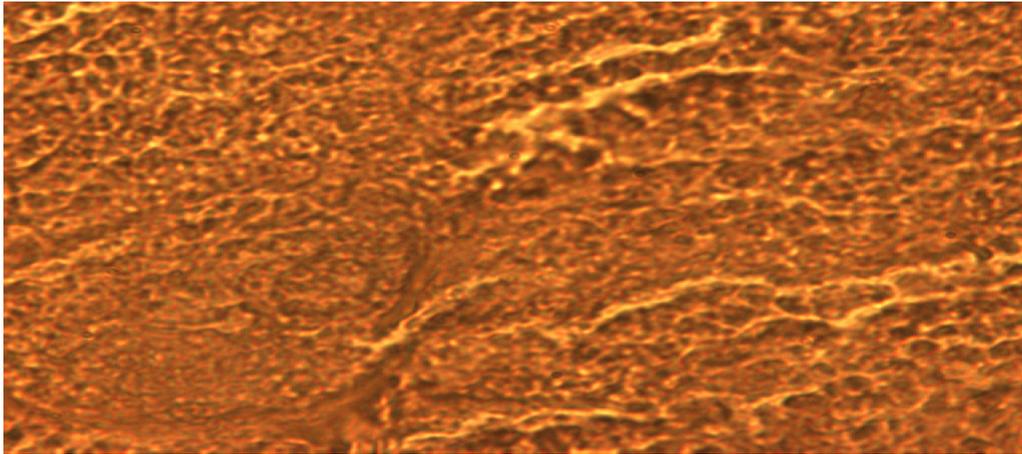


Рис. 10. Срез семенника кеты. Семенник содержит сперматозоидами разных порядков, границы ампул разрушены. Ув.: 20X100

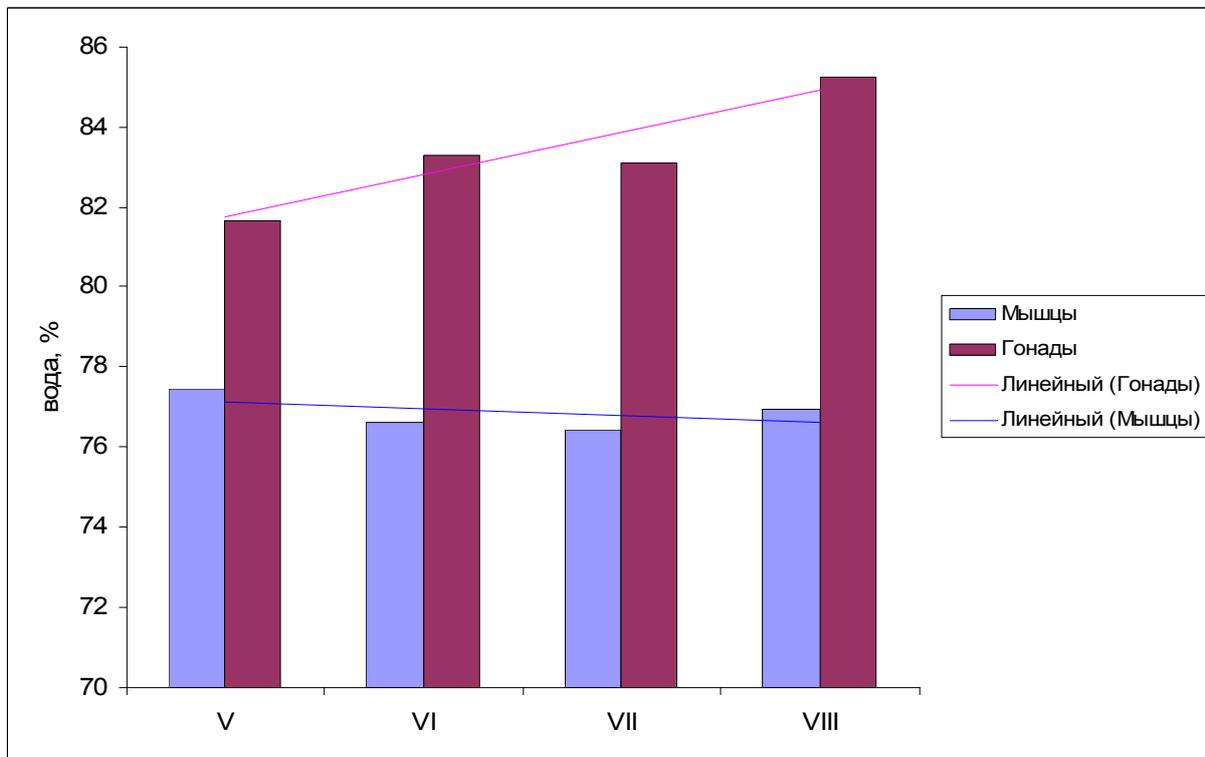


Рис. 11. Содержание воды (%) в гонадах и мышцах созревающих самцов кеты в 2000–2007 гг.

Увеличение содержания воды в семенниках созревающих самцов объясняется тем, что вода необходима для большей выживаемости спермиев, и результатом этих процессов – снижение общей калорийности гонад по сравнению с калорийностью мышц. Общая калорийность семенников кеты снизилась от мая к августу и составила 1008 кал./г и 725 кал./г, соответственно.

Таким образом, у самцов кеты, как и у самцов горбуши наблюдается рост содержания воды в семенниках и снижение в мышцах.

Нерка. В мае-июле созревающая нерка в возрасте ,2+ составляла 5%, в возрасте ,3+ – 55,3%. Созревающие самки нерки присутствовали во всех возрастных группах.

Гистологическое строение ооцитов, находящихся на различных ступенях развития, в гонадах созревающей нерки, аналогично таковым у кеты. В мае – июле в ооцитах яичников созревающих самок нерки уже заканчивался период большого роста, т.е. жировые вакуоли заполнили всю околоядерную цитоплазму.

В этот период в клетках яичников нерки происходило накопление энергетических веществ, в основном, жира. В мае жирность гонад созревающих самок в среднем составляла 10,7%, а в июле возросла до 13,2%, а в мышцах содержание жира было меньше (рис. 12). Общая калорийность половых желез самок нерки возрастала от 1745 кал./г в мае до 2379 кал./г в июле.

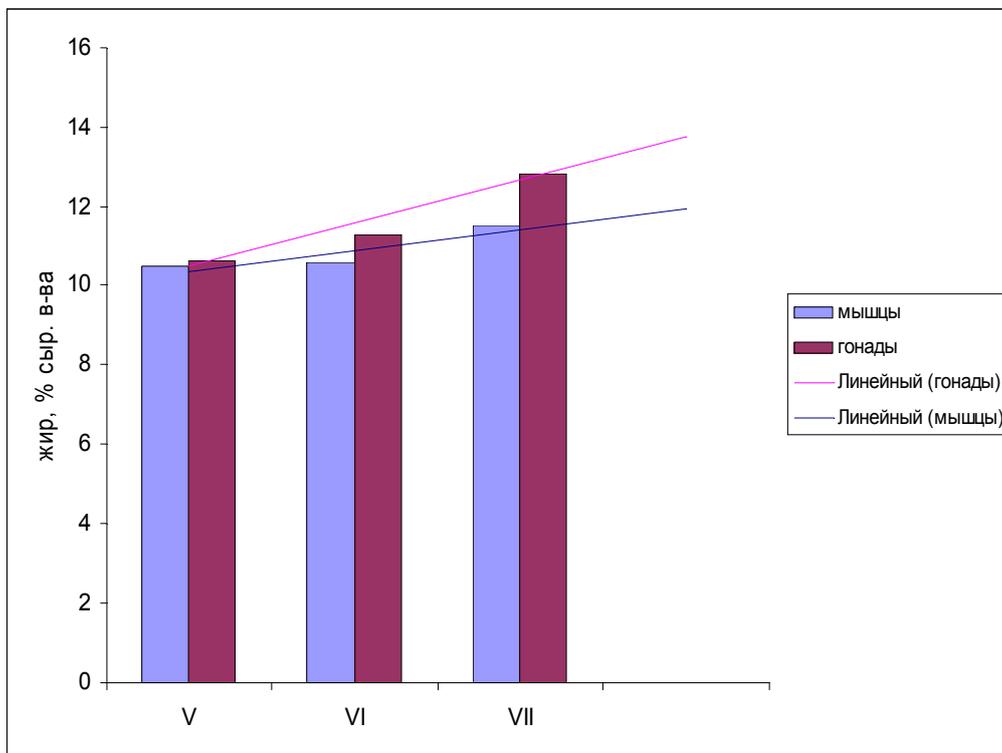


Рис. 12. Внутрисезонные изменения содержания жира (% сыр. в-ва) в гонадах и мышцах созревающих самок нерки в 2000–2007 гг.

Созревающих самок нерки были всех возрастов. Масса гонад созревающих самцов изменялась от 15,0 г (ГСИ – 0,74) в июне до 46,6 г (ГСИ – 1,70) в июле. В половых клетках созревающих самцов происходил процесс активного сперматогенеза. Основную массу половых клеток составляли сперматоциты разных порядков и сперматиды, как и у самцов кеты.

Количество воды в семенниках изменялось от 82,0% в мае до 83,2% в июле (рис. 13), и было значительно выше, чем в мышцах. Жирность гонад

варьировала в пределах от 2,4% в июне до 2,8% в июле. Калорийность половых желез самцов нерки изменялась от 794 кал./г до 918 кал./г, и зависела от содержания воды в гонадах ($r \pm m = -0,83 \pm 0,26$).

В этот период нагула самцов калорийность мышц была значительно выше.

Характерной особенностью созревающих самок нерки является накопление жира и увеличение калорийности яичников, а самцов – большое содержание воды в семенниках, поэтому показатель калорийности семенников значительно ниже, чем мышц.

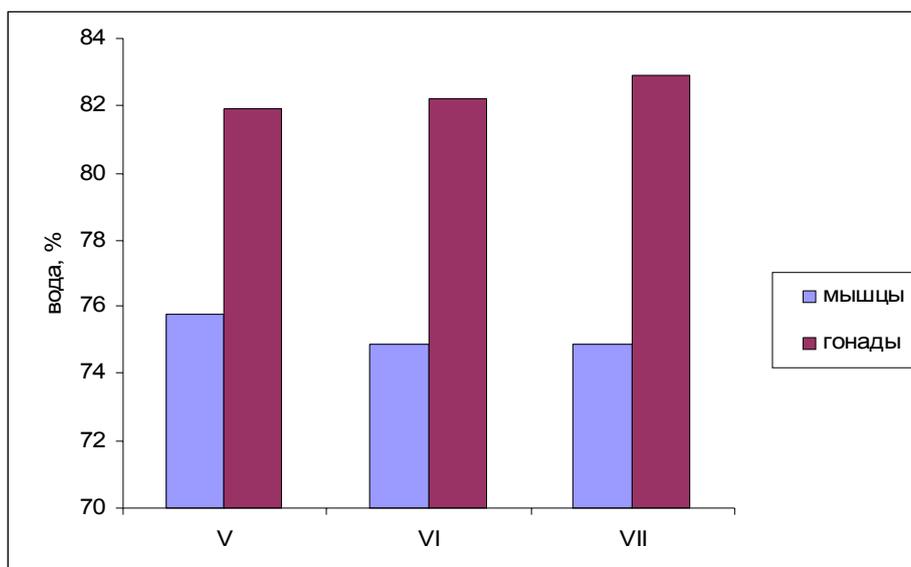


Рис. 13. Внутри сезонная динамика изменения содержания воды (% от сыр. в-ва) в семенниках и мышцах нерки (2000–2007 гг.).

Заключение

В период анадромных миграций происходило перераспределение энергетических веществ в организме созревающих горбуши, нерки и кеты. У самок процесс созревания половых желез требовал накопления жира в ооцитах. У самцов при созревании увеличивалось содержание воды в семенниках. Данные процессы в начале анадромных миграций (май, июнь) были выражены слабо, и зна-

чительно увеличивались к концу миграции (июль, август) при подходах к нерестовым рекам.

Особь горбуши продолжали активно питаться, когда процесс созревания гонад подходил к завершению, поэтому жиронакопления в мышцах и гонадах самок и самцов горбуши протекали синхронно. Горбуша заходила в реки с уже вполне созревшими гонадами, готовыми к вымету икры и молок, в то время, как дозревание половых желез у кеты и нерки продолжалось в пресной воде.

Литература

Анохина Л.Е. 1969. Закономерности плодовитости рыб на примере осеннее – и весенне-нерестующей салаки. М.: Наука, 261 с.

Бирман И. Б. 1985. Морской период жизни и вопросы динамики численности стада тихоокеанских лососей. М.: Агропромиздат, 208 с.

Бугаев В. Ф. 1995. Азиатская нерка. М.: Колос. 464 с.

Волкова О. В., Елецкий Ю. К. 1982. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. – 304 с.

Городовская С. Б., Шершнева В. И. 2010. Характеристика физиологического состояния созревающих лососей в период анадромных миграций. Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы III междунар. науч. конф. г. Петрозаводск: Изд-во Института биологии КарНЦ РАН, Вып. 3. С. 45–46.

Заварина Л. О. 2004. Некоторые данные о неполовозрелой кете *Oncorhynchus keta* (Walbaum) в летне-осенний период нагула в открытых водах Тихого океана // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей. Материалы V научной конференции. Петропавловск-Камчатский. С. 212–215.

Кизеветтер И. В. 1973. Биохимия сырья водного происхождения. М.: Пищ.пром. 442 с.

Карпенко В. И., Волков А. Ф., Коваль М. В. 2006. Питание тихоокеанских лососей, как индикатор состояния экосистемы Северной Пацифики Сб. науч. трудов. Петропавловск-Камчатский: КамчатНИРО, Вып. 8. С. 113–125.

Лав Р. М. 1976. Химическая биология рыб. М.: Пищ. Пром-сть, 349 с.

Шатуновский М. И. 1980. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 288 с.

Шершнева В. И. 1968. Динамика жирности кеты в открытом море в весенне-летний период 1966 г. // Труды 1-ой конференции молодых ученых г. Петропавловска-Камчатского. С. 25–34.

Shershneva V.I. 1991. Interannual variability in biochemical parameters of pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and chum (*Oncorhynchus keta*) fry in coastal waters of Kamchatka // In: Int. Symp. On Biol. Interactions of Enchanced and Wild Salmonids. Canada, 70 p.

Idler D.R. and Bitners J. 1960. Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration // Fish Res. Bd. Canada. Vol. 16, № 2. P. 223–241.

ВИДОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ УРОВНЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В КРОВИ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

И. И. Дорохова

Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, АР Крым, Украина,
e-mail: mirenri@bk.ru

Введение

В настоящее время продолжается поиск эффективных методов оценки воздействия человека на окружающую среду и видов, наиболее полно отражающих состояние акваторий. Белковый обмен, наряду с иммунной и антиоксидантной системами, является чувствительным маркером состояния гидробионтов (Вахтина и др, 2005). При негативном воздействии происходит сдвиг белкового обмена в сторону распада белков на олигопептиды, агрегация и окислительная модификация белковых молекул, которые более подвержены разложению ферментами нежели нативные белки (Дубинина, 1993). Избыточное появление олигопептидов в крови и отдельных органах приводит к эндогенной интоксикации, которая усиливает негативное влияние окружающей среды на организм (Титов, 2004; Карякина, 2004).

В связи с этим целью настоящей работы является изучение видовых особенностей уровня эндогенной интоксикации в крови некоторых видов черноморских рыб.

Материал и методы

Материалом для исследования служила кровь некоторых видов черноморских видов рыб (морская лисица *Raja clavata* Linne, морской кот *Dasyatis pastinaca* Linne, морской налим *Gaidropsarus mediterraneus* Linne, мерланг *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann), черноморская ставрида *Trachurus mediterraneus ponticus* (Aleev), темный горбыль *Sciaena umbra* Linne, ласкирь *Diplodus annularis* Linne, зеленушка-тинка *Crenilabrus tinca* Linne, звездочет *Uranoscopus scaber* Linne, ошибень *Ophidion rochei* (Muller), бычок-мартовик *Gobius batrachocephalus* (Pallas), бычок-кругляк *Neogobius melanostomus* (Pallas), глосса *Platichthys flesus luscus* (Pallas), морской

язык *Solea nasuta* (Pallas), барабуля *Mullus barbatus ponticus* (Essipov), черноморская сельдь *Alosa immaculate* (Bennett), морской ерш *Scorpaena porcus* Linne, кефаль сингиль *Liza aurata* (Risso), спикара *Spicara flexuosa* Linne).

Основные биологические особенности изучаемых видов представлены в табл. (Световидов, 1964, Васильева 2004).

Рыб отлавливали в двух бухтах в районе Севастополя и подвергали стандартному биологическому анализу. Кровь отстаивали на холоду сутки, отбирали сыворотку, эритроцитарную массу промывали физиологическим раствором для удаления остатков сыворотки и затем заливали дистиллированной водой (1 объем эритроцитарной массы : 4 объема дистиллированной воды) и оставляли при температуре 4 °С еще на 24 часа.

Уровень эндогенной интоксикации (ЭИ) определяли по содержанию средних молекул (молекул средней массы, олигопептидов). К 0,5 мл пробы добавляли 0,25 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и центрифугировали 30 минут при 3000 об/мин. 0,3 мл надосадочной жидкости вносили в 3,7 мл 3% NaOH, добавляли 0,2 мл реактива Бенедикта и инкубировали 15 минут, измеряли оптическую плотность при длине волны 330 нм. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури (Чиркин, 2002). Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

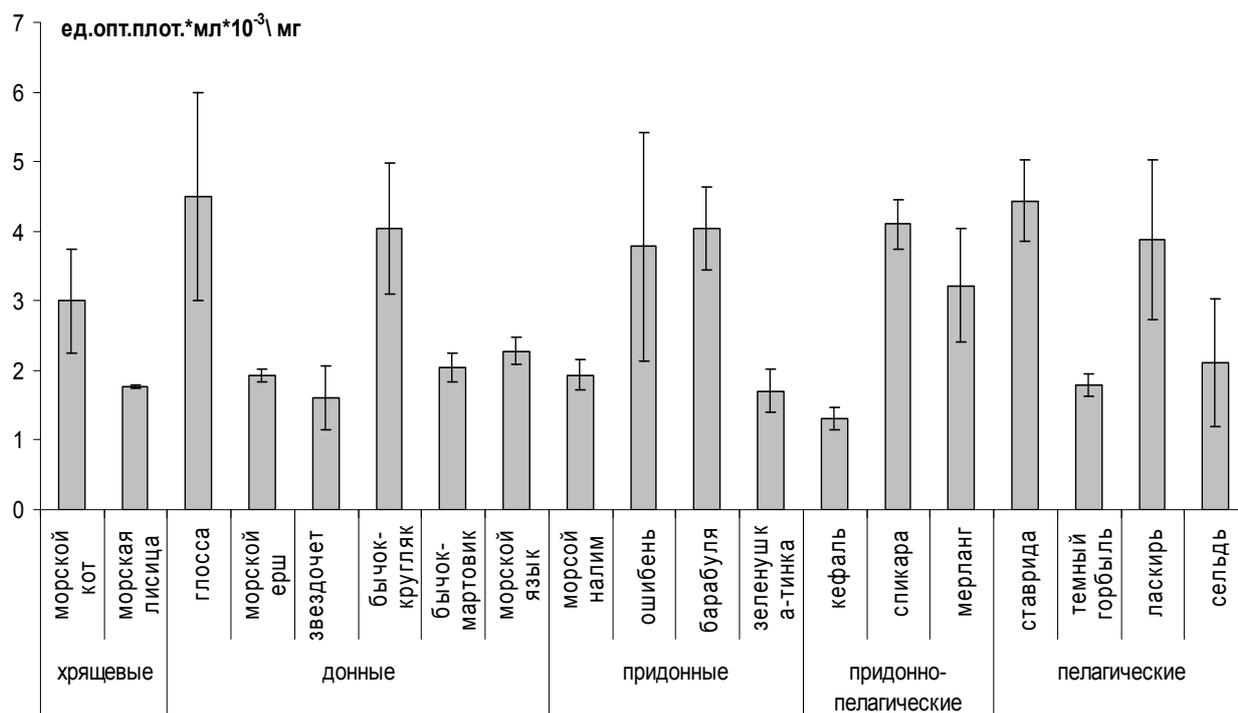
Результаты и обсуждение

Полученные данные, характеризующие уровень эндогенной интоксикации в крови изученных видов рыб представлены на рисунке. Максимальное содержание олигопептидов в крови были отмечены у глоссы, бычка-кругляка, ошибня, барабули, спикары, ставриды; минимальное у кефали-сингиля, морского ерша, звездочета.

Особенности биологии некоторых черноморских рыб

Вид	Экологическая группа	Нерест	Миграция	Отношение к солености	Отношение к температуре	Питание
Морской кот	донный	июнь–июль	*	+	т	Р, Рак
Морская лисица	- -	март–июль	**	+	т	Р, Рак, М
Морской ерш	донный	май–июнь	**	+	т	Р
Глосса	- -	январь–март	**	+/-	т	П, Р, Рак
Звездочет	- -	июль–сентябрь	*	+	т	Р, Рак
Бычок-кругляк	- -	апрель–июнь	*	+/-	т	М, Р, Рак
Бычок-мартовик	- -	февраль–май	**	+/-	т	Р
Морской язык	- -	июнь–сентябрь	**	+/-	т	П, Рак, Р
Морской налим	придонный	ноябрь–март	*	+	х	Р, Рак, П
Ошибень	- -	июнь–сентябрь	*	+	т	Р, П, Рак, М, Г
Султанка (барабуля)		май–сентябрь	*	+	т	П
Зеленушка-тинка	придон.-пелаг.	май–июнь	**	+	т	М, П
Кефаль-сингиль	- -	июль–ноябрь	*	+/-	т	Д
Спикара	- -	май–июль	**	+	т	смешанное
Мерланг	- -	декабрь–март	*	+	х	Р, Рак, П
Ставрида	пелагический	май–август	н/з	+	т	Р, Рак
Темный горбыль	- -	май–июль	*	+	т	Рак, Р
Ласкирь	- -	июнь–сентябрь	*	+	т	В, Г, П, Рак
Сельдь черноморская	- -	май–август	*	+/-	т	Р, Рак

Примечание. Р – рыбы, П – полихеты, Рак – ракообразные, М – моллюски, Г – губки, гидроиды, Д – детрит, В – водоросли; т – теплолюбивый, х – холодолюбивый; * – вид мигрирует, ** – вид не мигрирует, н/з – мигрирует незначительно; + – типично морской, +/- – солоноватоводный.



Видовые особенности содержания олигопептидов в крови рыб.

Уровень эндогенной интоксикации в крови морского кота несколько выше такового у морской лисицы. Значимых отличий между хрящевыми и костистыми рыбами установлено не было. У представителей донной группы досто-

верных отличий между морским ершом, звездочетом, бычком-мартовиком и морским языком не установлено. Уровень эндогенной интоксикации в крови бычка-кругляка и глоссы превышает показатели других видов рыб этой экологиче-

ской группы. В придонной группе следует отметить достоверно более высокое содержание олигопептидов в крови барабули по отношению к показателям налима и зеленушки-тинки. Среди придонно-пелагических рыб выделяется кефаль-сингиль, имеющая в 2 раза более низкий уровень содержания олигопептидов. Между мерлангом и спикарой отличий не выявлено. В группе изученных пелагических рыб отмечены достоверные отличия между ставридой и темным горбылем. Показатели ласкиря и сельди сильно варьируют.

Достоверных различий между разными экологическими группами установлено не было. Минимальные показатели в группе донных рыб у звездочета (1,6 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг), придонных – у зеленушки-тинки (1,7 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг), придонно-пелагических у кефали (1,3 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг) пелагических – у темного горбыля (1,8 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг); максимальные в группе донных – у глоссы (4,5 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг), придонных – у барабули (4 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг), придонно-пелагических – спикары (4,1 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг), пелагических – ставриды (4,4 ед. опт. плот.*мл*10⁻³/мг). Внутри групповые средние значения имеют тенденцию к возрастанию в ряду хрящевые → донные костистые и донные → пелагические (2,39 → 2,73 → 2,86 → 2,873,06 соответственно).

Различия в содержании олигопептидов в крови барабули и зеленушки-тинки могут быть связаны как с различной подвижностью данных видов (султанка более подвижна), так и с разницей кормовой базы.

Изученные придонно-пелагические виды значительно отличаются особенностями биологии. Солоноватоводная кефаль, питающаяся детритом, зачастую заходящая в загрязненные эстуарии рек (в частности р. Черная, впадающая в б. Севастопольская) имеет минимальные показатели уровня эндогенной интоксикации. Проведенные ранние исследования показали, что данный вид обладает высокой устойчивостью к различным ксенобиотикам (Руднева и др., 2000), поэтому процессы распада белков идут

не столь интенсивно или же утилизация олигопептидов как продуктов распада белков протекает достаточно быстро, что не приводит к их избыточному накоплению.

Исследуемый показатель в крови спикары более чем в 3 раза превышает таковой в крови кефали. Спикара также может заходить в опресненные низовья рек, но основу ее питания составляют водоросли, полихеты, ракообразные и мелкая рыба. Мерланг питается мелкой рыбой и ракообразными и уровень олигопептидов близок к значениям спикары. Поэтому можно предположить, что характер кормовой базы так же может оказывать влияние на содержание пептидов в крови.

Налим и мерланг являются холодолюбивыми видами, тем не менее, существенных различий между ними и теплолюбивыми видами установлено не было.

Темный горбыль и ставрида имеют сходство кормовой базы, активности и мест обитания, но различаются активностью в течение суток. Горбыль активен в ночное время суток, а ставрида в дневное. Исследуемая рыба отлавливалась ранним утром, поэтому можно предположить, что горбыль уже закончил питание, в то время как ставрида к нему еще не приступала, что и явилось причиной различий в уровне исследуемого показателя, или же это обусловлено только видоспецифичностью.

Согласно данным литературы иммунологические, прооксидантно-антиоксидантные показатели, а также некоторые соматические индексы не показали достоверных отличий между экологическими группами рыб. Однако отмечены широкая вариабельность и достоверные отличия между черноморскими видами, относящимися к одной группе (Кузьминова, 2010а; Кузьминова, 2010б; Кузьминова, 2008; Скуратовская, 2009).

Таким образом, уровень эндогенной интоксикации в тканях черноморских рыб является видоспецифичным, не зависящим от экологической группы и филогенетического положения, но имеет тенденцию к возрастанию от донных рыб к пелагическим, возможно подвержен влиянию подвижности и питания.

Литература

Васильева Е. Д. Популярный атлас – определитель. Рыбы. – М.: Дрофа, 2004. – 400 с.: ил.

Вахтина Т. Б., Рощина О. В., Скуратовская Е. Н. Использование биохимических индикаторов рыб в биомониторинге прибрежной части Черного моря /Заповедники Крыма: заповедное дело, био-

разнообразие, экообразование. Ч. II. Зоология. – Симферополь: КРА «Экология и мир», – 2005. – 257 с.

Дубинина Е. Е., Шугалей И. В. Окислительная модификация белков. // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113. – Вып. 1. – С. 71.

Карякина Е. В., Белова С. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // *Клин. лаб. диаг.* – 2004. – № 3. – С. 3–8.

Кузьмина Н. С. Видовые, сезонные, половые отличия индекса селезенки некоторых видов черноморских рыб и его подверженность антропогенному фактору // *Вест. зоологии* – 2008. – Т. 42. – № 2 – с. 135–142.

Кузьмина Н. С. Видовые и экологические особенности активности лизоцима в сыворотке крови черноморских рыб. // *Экол. системы и приборы*. – 2010а. – № 2 – с. 22–27.

Кузьмина Н. С. Концентрация малых циркулирующих иммунокомплексов в сыворотке крови некоторых черноморских рыб \ Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы III Междун. конф-ции с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов 22 июня – 26 июня 2010 года. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010б. – 216 с.

Лакин Г. Ф. Биометрия. / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 352.

Практикум по биохимии: Учеб. пособие / А. А. Чиркин. – Мн.: Новое Знание, 2002. – 512 с. – (Медицинское образование).

Руднева И. И., Чесалина Т. С., Кузьмина Н. С. Ответные реакции молоди черноморской кефали на загрязнение мазутом // *Экология* – 2000. – № 4 – с. 304–306.

Световидов А. Н. Рыбы Черного моря. – М.: Наука, 1964. – 467 с.

Скуратовская Е. Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.04 / Скуратовская Екатерина Николаевна. – Севастополь, 2009. – 148 с.

Титов В. Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогенны) как причина воспаления // *Клин. лаб. диаг.* – 2004. – № 5. – С. 3–10.

SPECIFIC PECULIARITIES OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN BLOOD OF THE BLACK SEA FISHES

I.I. Dorohova

*Institute of Biology of the Southern Seas, Ukrain, Sevastopol,
e-mail: mirenri@bk.ru*

The specific features of level of endogenous intoxication in blood of Black Sea fishes were investigated. Level of endogenous intoxication in tissues of Black Sea fishes is species-specific, not

depending on an ecological group and phylogenesis position, but has a tendency towards increasing from the bottom fishes to pelagian, possibly depend on mobility and feed.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕЧЕНИ МОРСКОГО ЕРША ИЗ БУХТ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И. И. Дорохова, Ю. В. Новоселова

*Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, АР Крым, Украина,
e-mail: mirenri@bk.ru; yunovosyolova@yandex.ru*

Введение

В настоящее время для оценки качества водной среды и ее пригодности для существования организмов все чаще применяются экотоксикологические методы. Они позволяют по откликам биоты, проявляющимися на всех уровнях организации, оценить экологическое состояние местообитаний (Adams, 2005).

Ранее было показано, что эффективными биомаркерами являются различные компоненты защитных систем – иммунной и антиоксидантной, реорганизация которых позволяет проанализировать состояние организма, подвергнутого действию неблагоприятных факторов (Winston G.W., Giulio R.N., 1991). При этом биохимические параметры, характеризующие реорганизацию обмена в условиях изменения среды обитания, являются наиболее оперативными и чувствительными к повреждающим факторам. Однако если организм в течение длительного времени находится в неблагоприятных условиях, то это приводит к изменениям на более высоких уровнях его организации – тканевом, органном и т.д. вплоть до популяционного. У рыб, обитающих в загрязненных акваториях, нарушается структура клеток и тканей за счет развития различных патологий и накопления токсикантов (Hinton & Lauren, 1990; Lang et al., 2006). Особенно часто подобные закономерности отмечены для печени, играющей центральную роль в депонировании ксенобиотиков, их биотрансформации и детоксикации.

Совершенно очевидно, что функциональная активность печени организмов, в течение длительного времени обитающих в неблагоприятных условиях, несет повышенную нагрузку, что сказывается на морфофизиологическом и биохимическом статусе. В этом случае индекс печени (ИП) и его вариации позволяют получить информацию о со-

стоянии организма и о его устойчивости к повреждающим факторам. Изменения на более глубоком уровне сказываются на различных метаболических процессах, в том числе, и на белковом обмене – синтезе и распаде белков, взаимопревращении аминокислот.

На этом основании целью настоящей работы является сравнительный анализ параметров индекса печени, эндогенной интоксикации и активности аминотрансфераз печени морского ерша из двух севастопольских бухт с разным уровнем антропогенной нагрузки.

Материалы и методы

Морского ерша *Scorpaena roscus* отлавливали в двух бухтах в районе Севастополя с различным экологическим статусом. Бухта Александровская отделена от открытой части моря молотом, в акватории имеется аварийный выпуск канализационных городских стоков. Бухта Карантинная свободно сообщается с открытой частью моря, на берегу также находится выпуск городского коллектора (рис. 1). Тем не менее, наиболее загрязненной по показателям воды, грунтов и рыб является б. Александровская (Кузьминова, 2010; Скуратовская 2009)

Отловленных рыб подвергали стандартному биологическому анализу, по результатам которого рассчитывали индекс печени по (формуле (1)), выражающий в ‰ (промилле) отношение массы печени рыбы к массе ее тушки. Выборки были дифференцированы по полу.

Статистическая оценка проводилась по Лакину (1990). Были составлены безинтервальные графики и проанализирован характер распределения индекса печени (ИП). По каждой выборке были вычислены стандартное отклонение и коэффициент вариации, также было проведено сравнение сред-

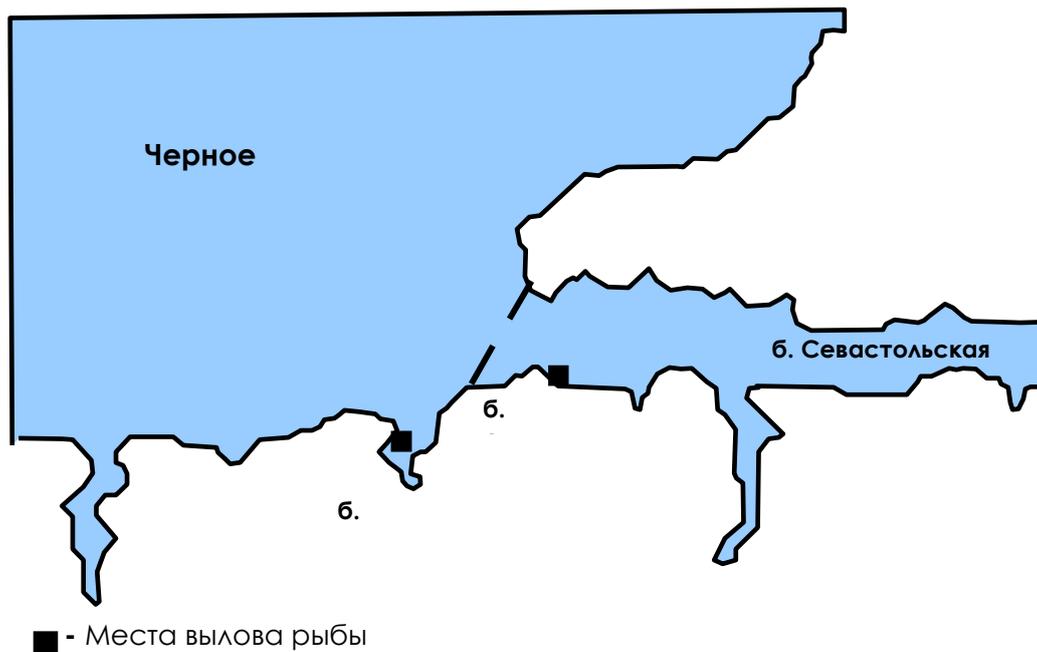


Рис. 1. Карта Севастопольской бухты с местами вылова рыбы

них значений индекса печени (ИП) по критерию достоверности Стьюдента.

$$ИП = \frac{P_n \cdot 1000}{P_m} \quad (1)$$

где P_n – масса печени, P_m – масса тушки.

Гомогенат печени готовили на холоду с добавлением 3 мл физиологического раствора, центрифугировали и использовали супернатант для дальнейших исследований.

Активность аминотрансфераз определяли по методу Райтмана-Френкеля с использованием стандартных наборов «Філісіт» – «АсАт» и «АлАт». К 0,04 мл гомогената добавляли 0,2 мл субстратно-буферного раствора и оставляли на 1 час при комнатной температуре, после этого приливали 0,2 мл стоп-реагента (2,4-динитрофенилгидразин) и инкубировали еще 20 минут. Затем добавляли 2 мл гидрокси натрия 0,4 N. Через 10 минут измеряли оптическую плотность исследуемой пробы против холостой (индивидуальной для каждого образца) при длине волны 500–530 нм. Делали пересчет на мг белка с учетом содержания белка в гомогенизате. Содержание белка определяли с использованием набора «Філісіт» – «Общий белок» Коэффициент де Ритиса рассчитывали как отношение активности АсАт к активности АлАт.

Уровень эндогенной интоксикации определяли по содержанию средних молекул (молекул средней массы, олигопептидов). К 0,5 мл пробы добавляли 0,25 мл 10% раствора трихлоуксусной кисло-

ты и центрифугировали 30 минут по 3000 об/мин. 0,3 мл надосадочной жидкости вносили в 3,7 мл 3% NaOH, добавляли 0,2 мл реактива Бенедикта и инкубировали 15 минут, измеряли оптическую плотность при длине волны 330 нм. Пересчитывали на концентрацию белка в пробе.

Статистический анализ проводили с использование t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Статистические показатели печени морского ерша из двух бухт представлены в табл. Результаты исследований не показали достоверных различий между значениями ИП печени самок и самцов в каждой бухте. Однако ИП самок из бухты Карантинной был достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем рыб из бухты Александровской, у самцов различий не установлено. Следует отметить, что показатели вариации ИП у самок из обеих бухт выше, чем у самцов, а у рыб из бухты Карантинной выше, чем у рыб из бухты Александровской.

Активность аминотрансфераз в печени ерша из двух бухт представлены на рис. 2. Активность АлАт одинакова в печени самцов и самок из б. Карантинная, а в б. Александровской показатели самок достоверно превышают значение самцов (рис. 2.А). Активность фермента в печени самок из обеих бухт не различается, а у самцов из Александровской бухты этот показатель достоверно ниже.

Статистические показатели ИП морского ерша из двух бухт Севастополя в 2009 г.

б. Александровская			б. Карантинная		
Показатели	♀	♂	Показатели	♀	♂
Количество n	39	19	Количество n	161	214
Разброс R (min – max)	7,50–41,70 34,20	8,54–32,68 24,14	Разброс R (min – max)	5,33–66,27 60,94	3,04–60,38 57,34
Среднее M ± m	17,32 ± 1,46	19,57 ± 1,63	Среднее M ± m	22,97 ± 1,10	21,11 ± 0,73
Стандартное отклонение σ	9,14	7,10	Стандартное отклонение σ	13,90	10,62
Коэффициент вариации V, %	52,79	36,29	Коэффициент вариации V, %	60,51	50,32
Коэффициент асимметрии As	1,28	0,42	Коэффициент асимметрии As	1,36	1,49

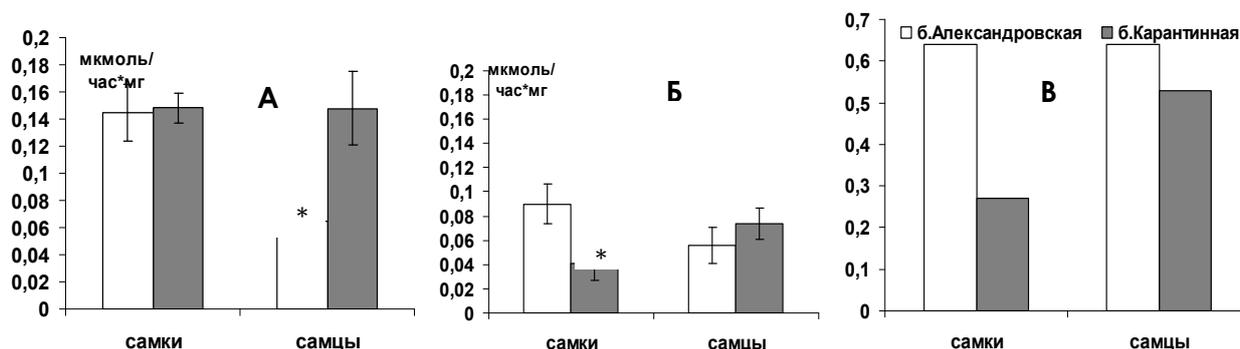


Рис. 2. Активность аминотрансферах в печени морского ерша
(А – активность аланинаминотрансферазы, Б – активность аспаратаминотрансферазы,
В – коэффициент де Ритиса)

* – достоверность различий показателей рыб разного пола

Активность АсАт варьирует неоднозначно: в б. Александровской бухте активность фермента достоверно выше у самок, в б. Карантинной у самцов (рис. 2.Б). Следует отметить достоверное превышение активности фермента в печени самок из б. Александровской, тогда как у самцов достоверных различий не обнаружено.

Коэффициент де Ритиса одинаков у самок и самцов из б. Александровская, но выше у самцов из б. Карантинная (рис. 2.В). В обоих случаях коэффициент де Ритиса выше у рыб из б. Александровская по сравнению с Карантинной.

Уровень эндогенной интоксикации в печени ерша представлен на рис. 3.

Данный показатель не имеет различий в печени самок и самцов в обеих бухтах. Однако у самок из б. Карантинная он достоверно выше по сравнению с соответствующим показателем рыб из б. Александровской. У самцов отмечена сходная тенденция, но различия в данном случае не достоверны.

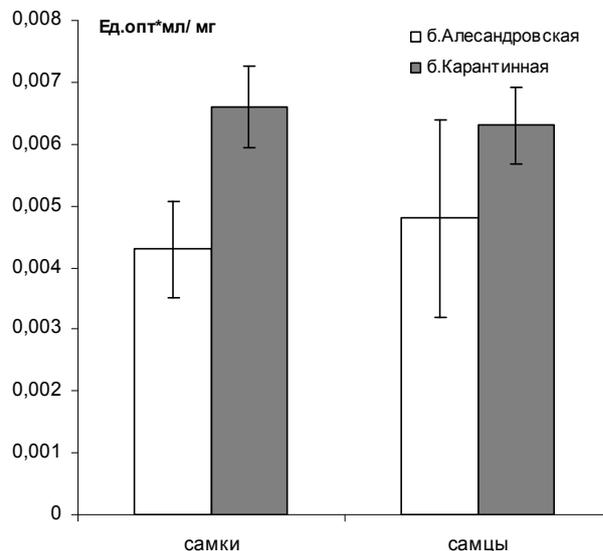


Рис. 3. Уровень эндогенной интоксикации в печени морского ерша

Таким образом, результаты исследований показали определенные различия ответных реакций печени самок и самцов рыб на антропо-

генное загрязнение. Не смотря на отсутствие достоверных отличий среднестатистических показателей ИП у рыб обоих полов из двух бухт следует отметить большую вариабельность ИП у самок по сравнению с самцами, более выраженную у самок из бухты Карантинной. Это может быть следствием влияния среды обитания, характеризующейся как большой изменчивостью (б. Карантинная), так и повышенной антропогенной нагрузкой, обусловленной постоянной работой городского коллектора.

Активность аминотрансфераз в печени рыб проявляет определенные различия у особей из двух бухт. Если в печени самок из обеих бухт активность АлАт одинакова, то активность АсАт ниже у рыб из Карантинной бухты. У самцов противоположная тенденция – активность АсАт не различается у рыб из обеих акваторий, а АлАт доминирует у рыб из бухты Карантинная, в то же время коэффициент де Ритиса (АсАт/АлАт) выше у рыб из б. Александровская, что свидетельствует об однотипных изменениях активности аминотрансфераз у рыб из более загрязненной бухты. В этом случае ферментативный баланс смещен в сто-

рону увеличения активности АлАт в печени рыб из бухты Александровской по сравнению с бухтой Карантинной. Ранее было показано достоверное повышение активности аспартатами-нотрансферазы в сыворотки крови морского ерша в б. Карантинная в летний период, а коэффициент де Ритиса у представителей обоих полов ниже в б. Мартынова (бухта, располагающаяся рядом с б. Александровская за молом) (Рощина, 2010).

Одновременно у рыб и бухты Карантинной отмечено повышение концентрации продуктов ЭИ, что свидетельствует о недостаточной эффективности систем детоксикации и нарушении общей метаболической активности печени у рыб из более загрязненных акваторий.

На основании проведенных исследований можно заключить, что экологическое состояние среды обитания оказывает существенное влияние на обменные процессы в печени. Изменчивость абиотических и биотических факторов в комплексе с антропогенной нагрузкой вызывают усиление вариабельности ИП, смещение баланса активности аминотрансфераз и активацию процессов эндогенной интоксикации.

Литература

Кузьмина Н. С. Популяционные, морфофизиологические и биохимические показатели спикары *Spicara flexuosa* (Rafinesque) в современный период /Матер. V Муждунар. научно-практ. конф. «Человек и животные» (г. Астрахань, 14–16 мая 2010 г.) / сост.: М. В. Лозовская. – Астрахань: Астраханский государственный университет, издательский дом «Астраханский университет», 2010. – 195 с.

Лакин Г. Ф. Биометрия. / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 352.

Практикум по биохимии: Учеб. пособие / А. А. Чиркин. – Мн.: Новое Знание, 2002. – 512 с. – (Медицинское образование).

Рощина О. В. Влияние природных и антропогенных факторов на активность ферментов сыворотки крови черноморских рыб (на примере морского ерша): автореферат на дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.04 / Рощина Ольга Владимировна. – Москва, 2010. – 20 с.

Скуратовская Е. Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.04 / Скуратовская Екатирина Николаевна. – Севастополь, 2009. – 148 с.

Adams S.M. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems / S.M. Adams // Mar. Pollut. Bull. – 2005. – Vol. 51, № 8–12. – P. 649–657.

Lang T., Wosniok W., Barsiene J., Broeg K., Kopecka J., Parkkonen J. Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys fleus*) as indicator of biological effects of contaminants // Marine Pollution Bulletin, 2006. – V. 53. – p. 488–496.

Hinton, D.E. & Lauren D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes / Biological Indicators of Stress in Fish. (ed. S.M. Adams). – 1990. – Pp. 51–66.

Winston G.W. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms / G.W. Winston, R.N. Giulio // Aquatic Toxicol. – 1991. – Vol. 19. – P. 137–161.

PECULIARITIES OF MORPHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN SCORPIONFISH LIVER INHABITING IN BAYS WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIES INFLUENCE

I.I. Dorohova, J.V. Novoselova

*Institute of Biology of the Southern Seas, Ukrain, Sevastopol,
e-mail: mirenri@bk.ru; yunovosyolova@yandex.ru*

Peculiarities of morphophysiological and biochemical parameters in scorpionfish liver inhabiting in Sevastopol's bays were investigated. Hepatic index was higher for both genders of fish taken from Karantinnaya bay. Aminotranferase activity was different for males and females inhabiting at investigated bays. Males had higher alanine aminotransferase activity at Karantinnaya bay, females had higher aspartate aminotransferase activity at

Aleksandrovskaya bays. The factor of de Ritis has shown that the aluminous exchange in a liver is displaced towards to increasing of alanine aminotransferase activity for fish from Aleksandrovskaya bay. Content of oligopeptides in liver also had shown increasing for fish at Karantinnaya bay. Investigated morphophysiological and biochemical parameters in liver may be used for evaluation anthropogenies influence on aquatic systems.

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ ГОДОВАЛЫХ ОСОБЕЙ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS* К КАДМИЮ

А. Ф. Жуковская, В. П. Челомин

Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева, г. Владивосток, Россия,
e-mail: avianna@poi.dvo.ru

Введение

В числе различных форм антропогенного воздействия на морскую среду одно из ведущих мест принадлежит возрастающему поступлению в акватории тяжелых металлов (ТМ). Общепринято, что важная роль в метаболизме металлов, как жизненно необходимых, так и токсичных для организма принадлежит металлотионеинам (Petering, Fowler, 1986; Kagi, Kojima, 1987; Roesijadi, 1991), которые так же способны выполнять и функцию антиоксиданта в организме (Thomas Muller, Rainer Schuckelt and Lothar Jaenicke., 1994; Ramana Kumari M. V., Midori Hiramatsu and Manuchair Ebadi, 1998). Однако МТ не единственная группа белков, способных связывать тяжелые металлы. На сегодняшний день некоторыми авторами (Stone et al., 1986, Jin-Sung Park, Soohee Chung, Il-Seon Park et al., 2002) так же охарактеризованы и другие металлсвязывающие комплексы.

Среди ТМ кадмий считается одним из основных поллютантов, который способен накапливаться в органах и тканях различных видов гидробионтов и вызывать в них патологические изменения и, как следствие, гибель всего организма. Однако такие гидробионты, как некоторые виды моллюсков, способны аккумулировать этот токсичный металл без какого-либо видимого патологического эффекта. Причины такой способности до сих пор остаются неизвестными.

У представителей моллюсков сем. Pectinidae (Bivalvia) были обнаружены чрезвычайно высокие концентрации кадмия в почках и пищеварительной железе даже в видах, обитающих в акваториях с низким содержанием кадмия в морской воде (Mauri et al., 1990; Viarengo et al., 1993; Bustamante and Miramand, 2004). Этот факт говорит о том, что представители сем. Pectinidae обладают высокой степенью пластичности метаболизма, благодаря которому способ-

ны адаптироваться к поступлению кадмия в окружающую среду и выживать в условиях повышенного содержания этого токсичного металла в морской воде.

Среди дальневосточных представителей сем. Pectinidae наиболее интересным является приморский гребешок (*Mizuhopecten yessoensis*), который способен накапливать высокие концентрации кадмия в мягких тканях, благодаря способности связывать этот металл с высокомолекулярными Cd-связывающими белками. Однако ничего не известно об особенностях функционирования биохимического аппарата адаптации приморского гребешка к кадмию в зависимости от возраста.

Целью данной работы являлось выявить особенности в механизмах адаптации годовалых особей (1⁺) приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* к высокотоксичному кадмию.

Материал и методы

Годовалые особи приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* были отобраны из экологически чистой акватории бухты Северная залива Петра Великого Японского моря.

Пищеварительную железу приморского гребешка извлекали для дальнейшего проведения биохимических исследований. Кусочки ткани гомогенизировали в 0,02 М Трис-НСl буфере рН 8,5 в присутствии 1мМ PMSF (для ингибирования действия протеаз) и 10 мМ DTT (для предотвращения окисления сульфгидрильных групп цистеиновых остатков). Полученный гомогенат центрифугировали при 10 тыс. об. в мин. в течение 50 мин. Супернатант (цитозоль) тщательно отделяли от осадка и определяли содержание в нем Cd, Zn и Cu.

Водорастворимые цитоплазматические белки разделяли с помощью гель-хроматографии на

Supera 12 с соблюдением условий и рекомендаций, разработанных для морских организмов (Roesijadi and Fowler, 1991). Белковые фракции элюировали 0,05 М Трис-НСl в присутствии 0,15 М NaCl (рН 7,0) со скоростью протока 0,4 мл/мин. Выход фракций регистрировали при λ 280 нм. В процессе хроматографии элюат отбирали для определения содержания Cd.

Для определения концентрации белка использовали метод Лоури (Lowry, 1951). Калибровочные кривые строили по растворам бычьего сывороточного альбумина, концентрации которого рассчитывали на основе коэффициента молярной экстинкции.

Оценка общей антирадикальной активности (TOSC – total oxuradical scavenger capacity) проводилась по способности образца ингибировать (восстанавливать) радикал-катион АВТС⁺ (Re Roberta et al., 1999). Для получения радикал-катионов АВТС⁺ смешивали водные растворы АВТС и персульфата калия с концентрациями 7 мкмоль/л и 2,5 мкмоль/л соответственно. Формирование АВТС⁺ происходило в темноте при комнатной температуре в течение суток. Для оценки антирадикальной активности конечную концентрацию АВТС⁺ довели до $0,7 \pm 0,05$ единиц оптической плотности при длине волны 734 нм. В зависимости от концентрации белка в исследуемых образцах добавляли по 10–25 мкл исследуемого раствора к 3 мл радикал-катионов АВТС⁺, что вызывало подавление АВТС⁺ в интервале от 20 до 70%. Реакцию проводили в темноте в течение 5 мин. Антирадикальную активность выра-

жали как процент ингибирования АВТС⁺ по формуле: % ингибирования = $100 \cdot (A_1 - A_2 / A_1)$, где A_1 – оптическая плотность раствора АВТС⁺ на длине волны 734 нм, A_2 – оптическая плотность раствора АВТС⁺ в присутствии исследуемого образца. Значения антиоксидантной активности исследуемых образцов выражали как миллимолярную концентрацию тролокса на мг белка.

Результаты

Получено, что в пищеварительной железе у контрольной группы приморского гребешка 80% всего аккумулированного кадмия содержится в цитоплазматической фракции (фракция А), при этом на 1 мг белка приходится около 0,03 мкг кадмия.

После многоэтапного фракционирования (температурное осаждение, осаждение органическим растворителем), доля цитоплазматического кадмия во фракции (фракция В), полученной после 80% ацетонного осаждения составляет 8%. Получено так же, что на 1 мг белка приходится до 0,5 мкг кадмия.

У особей, находящихся в условиях повышенного содержания кадмия в среде в цитоплазматической фракции пищеварительной железы содержится только 50% аккумулированного кадмия, при этом на 1 мг белка приходится около 0,3 мкг кадмия. На долю 80% ацетонного осадка приходится до 50% всего кадмия, содержащегося в цитоплазме, что составляет 15 мкг кадмия на 1 мг белка (рис. 1).

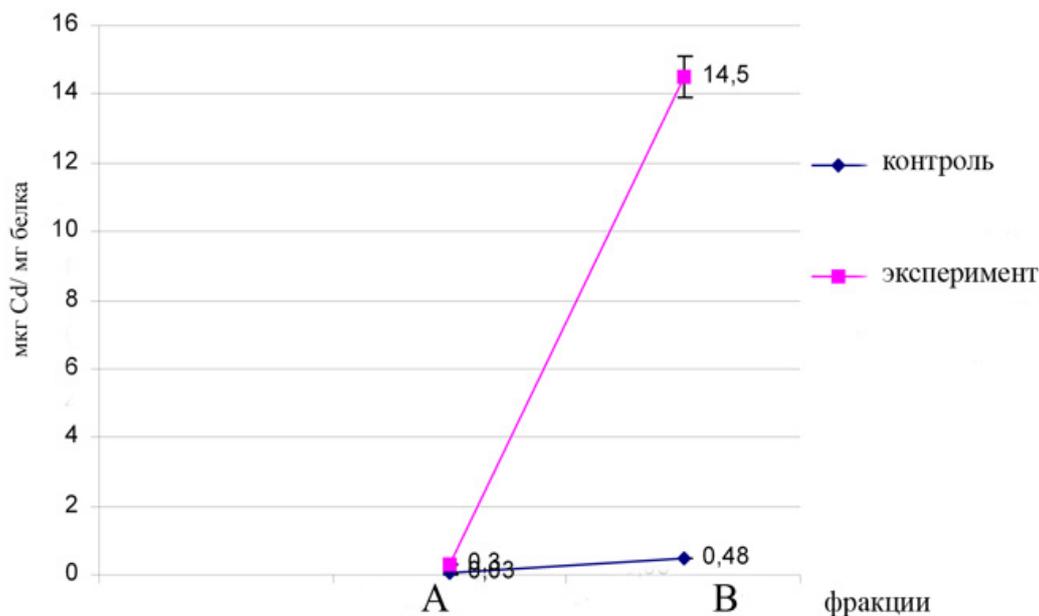


Рис. 1. Субклеточное распределение кадмия в годовалых особях приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

Анализ содержания микроэлементов показал, что кроме токсичного кадмия пищеварительная железа годовалых особей содержит и такие физиологически важные металлы, как Cu и Zn. При этом на долю термостабильных, устойчивых к органическим растворителям белков при-

ходитесь значительная доля цинка. Соотношение Cd: Zn : Cu фракции В составляет 1 : 3 : 1. (рис. 2).

Эксперимент по аккумуляции кадмия показал изменение в соотношении кадмия, цинка и меди (14 : 4 : 1), по сравнению с контролем (рис. 3).

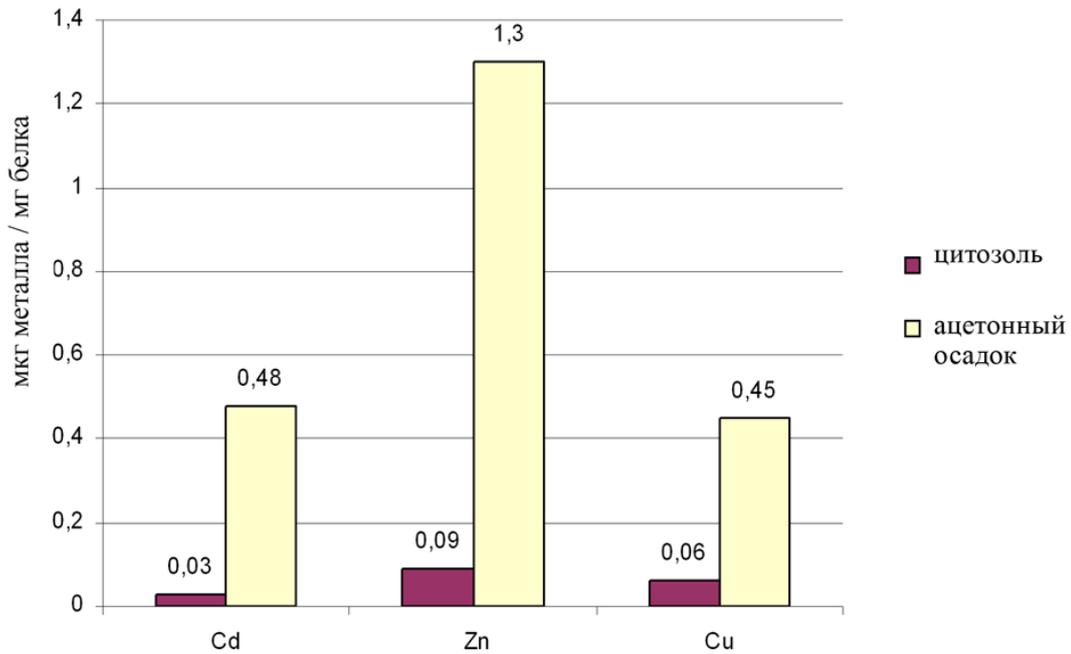


Рис. 2. Субклеточное распределение Cd, Zn Cu в пищеварительной железе контрольной группы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

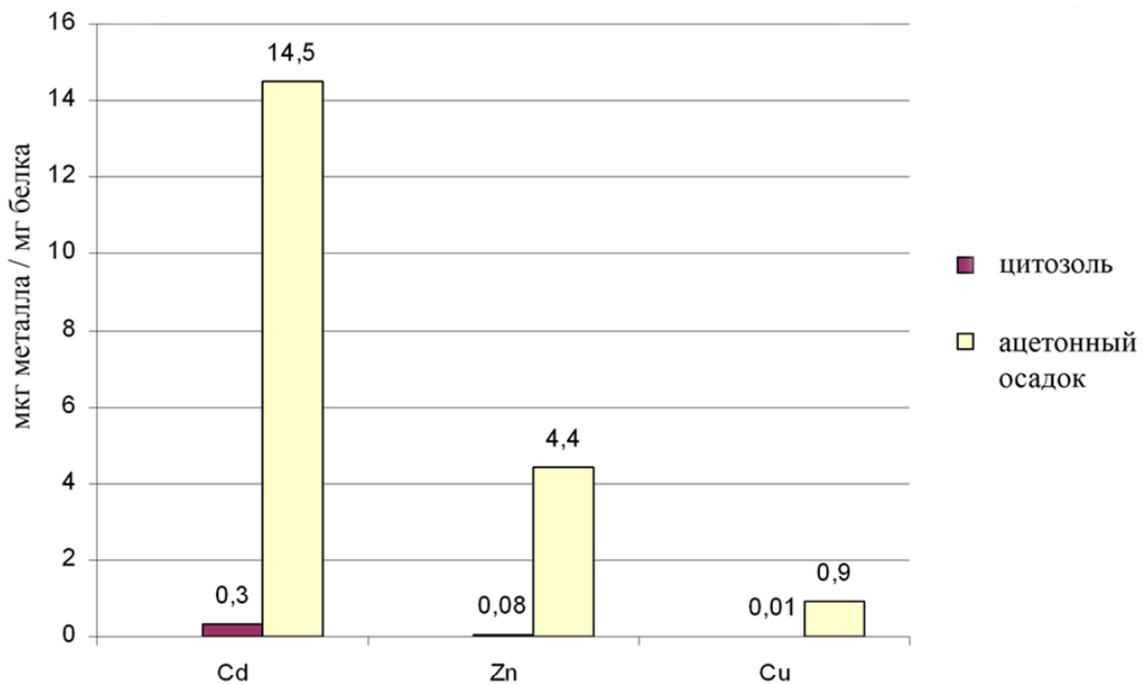


Рис. 3. Субклеточное распределение Cd, Zn Cu в пищеварительной железе годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* после инкубации кадмием ($CdCl_2$, 300 мкг/л)

Фракцию В, ресуспендированную в 0,02 М Tris-HCl буфере pH 8,5, разделили методом высоко скоростной проточной жидкостной хроматографии FPLC на колонке Superosa 12. Получено три кадмий-содержащих пика, соответствующих белкам с высоким молекулярным весом в области 120 кДа, 72 кДа и 43 кДа. Найдено, что все три идентифицированных белка связывают токсичный кадмий как в контрольной, так и в экспериментальной группах исследуемых моллюсков (рис. 4).

Получено, что в естественных условиях в годовалых особях *M. yessoensis* кадмий связывается главным образом с белком 43 кДа (90 мкг). Однако в особях, подвергнутых обработке кадмием, происходит перераспределение токсичного кадмия с белка 43 кДа (6 мкг) на белок 120 кДа (60 мкг). Интересно, что белок с молекулярным весом 72 кДа не менял своего сродства к кадмию вне зависимости от условий эксперимента.

Оценка антиоксидантной активности идентифицированных кадмий-связывающих белков в годовалых особях приморского гребешка *M. yessoensis* проводилась по их способности ингибировать (восстанавливать) радикал – катионы ABTS⁺. Изучение антиоксидантных свойств показало значительное различие в значениях как между кадмий-связывающими белками в контрольных моллюсках, так и при сравнении контрольной

группы с экспериментальной группой гребешков. Результаты показали (рис. 5), что в естественной среде обитания кадмий-связывающие белки связывают аккумулированный кадмий и имеют следующие значения: для белка 120 кДа – 86 ммоль Тролокса / мг белка, для белка 72 кДа – 114 ммоль Тролокса / мг белка и для белка 43 кДа – 109 ммоль Тролокса / мг белка.

В экспериментальных условиях для этих же белков значения антиоксидантной (АО) активности изменились (рис. 6): для белка 120 кДа – 60 ммоль Тролокса / мг белка, для белка 72 кДа – 124 ммоль Тролокса / мг белка и для белка 43 кДа – 72 ммоль Тролокса / мг белка.

Интересно, что наибольшей антиоксидантной активностью в пищеварительной железе приморского гребешка обладает кадмий-связывающий белок 72 кДа как при фоновом, так и при высоком содержании кадмия в среде. Интересно, что в условиях нагрузки кадмием этот белок не принимает участия в аккумуляции этого металла, и доля связанного кадмия с белком сравнима контролем. Получено так же, что после инкубации с кадмием кадмий-связывающие белки, принимающие основное участие в связывании кадмия (120 кДа и 43 кДа) имеют более низкие значения АО активности по сравнению с контролем. Отмечено, что кадмий-связывающий белок 120 кДа обладает более низкими показателем АО активности в обоих условиях эксперимента.

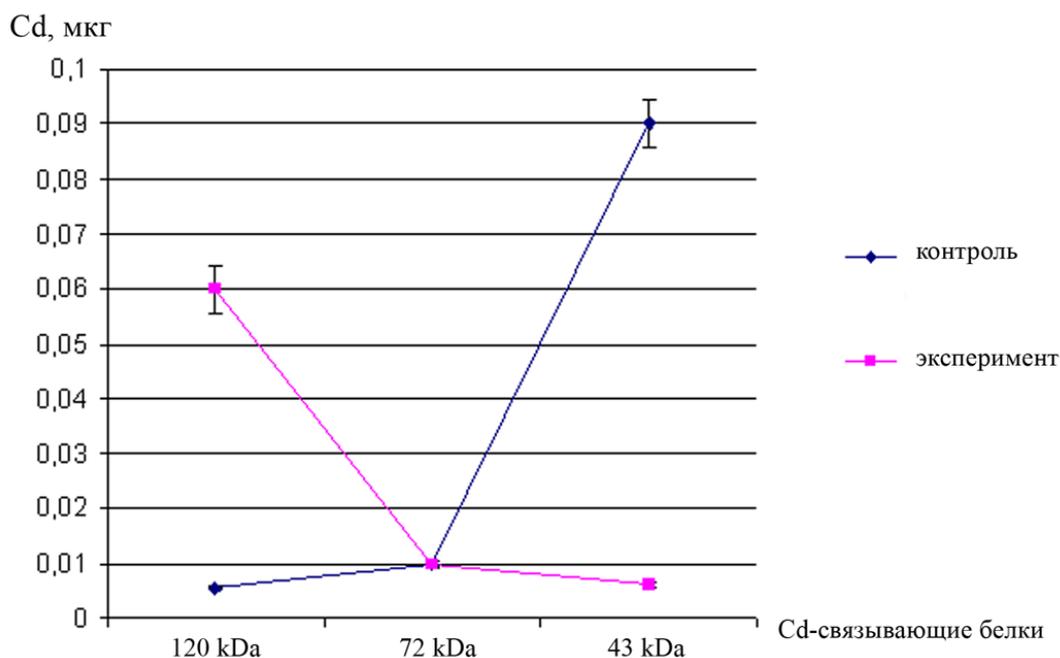


Рис. 4. Распределение кадмия среди кадмий-связывающих белков пищеварительной железы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

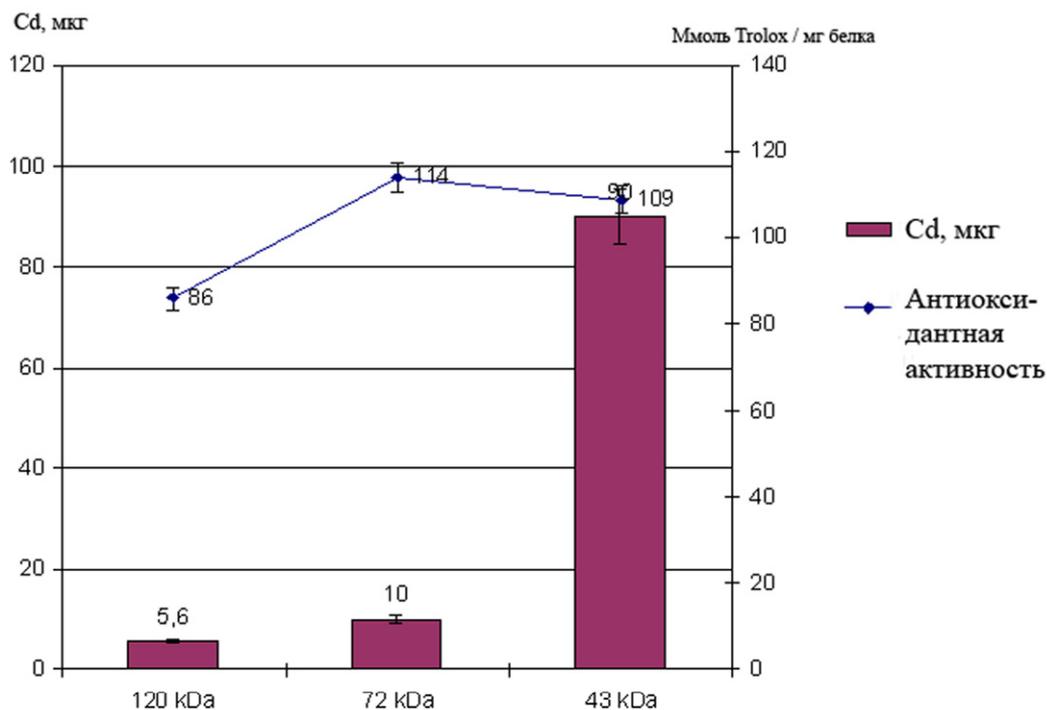


Рис. 5. Корреляция между содержанием кадмия и антиоксидантной активностью в кадмий-связывающих белках пищеварительной железы контрольной группы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

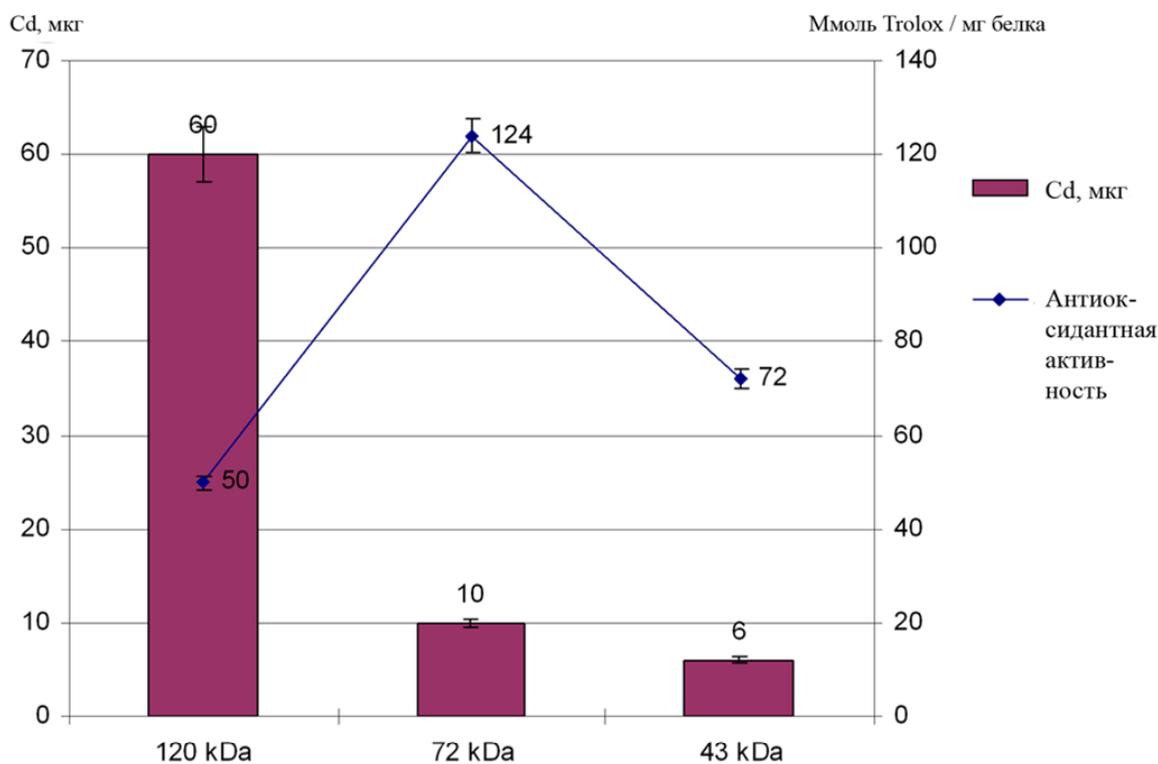


Рис. 6. Корреляция между содержанием кадмия и антиоксидантной активностью в кадмий-связывающих белках пищеварительной железы годовалых особей приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, после обработки кадмием ($CdCl_2$, 300 мкг/л)

Из рисунков 5 и 6 видно так же, что эксперимент по содержанию приморского гребешка *M. yessoensis* в среде с повышенной концентрацией кадмия (300 мкг / л) обнаружил, что годовалые особи этого вида уже имеют хорошо развитую систему адаптации к этому токсичному металлу. Однако в ответ на чрезвычайно высокие концентрации кадмия, обнаруженные металлсвязывающие белки теряют показатели АО активности в среднем на 20–30 единиц.

Обсуждение

В работе впервые исследована способность возрастной группы 1⁺ приморского гребешка *M. yessoensis* к аккумуляции кадмия в естественных и лабораторных условиях. Результаты данного исследования продемонстрировали, что годовалые особи приморского гребешка *M. yessoensis* способны накапливать в пищеварительной железе токсичный кадмий вне зависимости от условий эксперимента. Кроме того, повышенное содержание кадмия в окружающей среде вызывает интенсивное накопление этого металла в клетках пищеварительной железы гребешков без видимого патологического эффекта. На данном представителе сем Pectinidae ранее Челомин с соавторами (Chelomin et al., 1995) исследовали способность половозрелых особей приморского гребешка к аккумуляции кадмия и показали, что взрослые особи способны накапливать кадмий, главным образом, в почках и пищеварительной железе (100 мкг Cd / г сухого веса в контроле и 700 мкг Cd / г сухого веса на 14 день эксперимента). Так же этими авторами было показано, что аккумуляция кадмия вызывает перераспределение меди, цинка и железа в пищеварительной железе. Таким образом, можно предположить, что в процессы накопления и детоксикации кадмия вовлекаются жизненно-важные микроэлементы, особенно цинк и медь. Это предположение находит подтверждение в дальнейшем исследовании молекулярных механизмов, участвующих у приморского гребешка *M. yessoensis* в аккумуляции этого токсичного металла (Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Chelomin V. P., 2008).

В данном исследовании идентифицированы три высокомолекулярных, термостабильных, устойчивых к органическим растворителям белковых компонента в пищеварительной железе годовалых особей приморского гребешка, участвующих в связывании кадмия (120 кДа, 72 кДа и 43 кДа). В настоящий момент известно, что та-

кие свойства как термостабильность и устойчивость к органическим растворителям характерны для белков – металлотионеинам (МТ) и МТ-подобным белкам, которым принадлежит ведущая роль в связывании высокотоксичных металлов, в том числе и кадмия. Эти специфические белки обнаружены во многих представителях морских беспозвоночных (Jin-Shung Park et al., 2002; Dallinger et al., 1993; Giguere et al., 2003). Так в клетках пищеварительной железы *Pecten maximus*, основная роль в связывании и детоксикации Cd принадлежит высокомолекулярным белкам (Stone et al., 1986). Авторам удалось показать, что кадмий в пищеварительной железе *P. maximus* распределяется между тремя цитоплазматическими компонентами – 150 кДа, 55 кДа и 10 кДа. В северо-атлантическом представителе семейства Pectinidae *Adamussium colbecki* (Ponzano, 2001) был обнаружен в пищеварительной железе кадмий-связывающий низкомолекулярный белок (10 кДа). Все это свидетельствует о хорошо развитых и высоко вариабельных механизмах адаптации к высокотоксичному кадмию у представителей этого семейства.

Известно, что в ответ на действие прооксидантов организм реагирует каскадом реакций – антиоксидантным ответом. Одним из вариантов антиоксидантной защиты организма в ответ на стресс различной природы в организме морских беспозвоночных повышается уровень МТ (Viarnго et al., 1988; Zapata-Vivenes E., and Nusetti O., 2007). Поэтому эти белки нередко используются исследователями в качестве биомаркеров специфического стресса.

В нашем исследовании была выявлена и оценена способность Cd-связывающих белков проявлять свойства антиоксиданта в организме приморского гребешка в ответ на поступление в организм кадмия. Подобные исследования были выполнены Виаренго с коллегами (Viarnго et al., 1999), где авторы показали, что в мидии *Mytilus galloprovincialis* аккумуляции кадмий связывается с МТ, которые при нетоксичной дозе Cd обладают свойствами антиоксиданта. Так же, в *Mytilus galloprovincialis* Камю с соавторами (Camus et al., 2004) исследовали суммарный антиоксидантный потенциал (TOSC – Total Oxуradical Scavenger Capacity) у мидий, пересаженных из экологически чистого района в акваторию Веницианского залива, испытывающего на себе антропогенную нагрузку. Авторы не выделяли индивидуальные металлсвязывающие белки, тем не менее, на общей цитозольной фракции клеток пищеварительной железы

M. galloprovincialis они показали, что уровень антиоксидантного потенциала (TOSC) возрастает и достигает максимума после двухнедельного пребывания мидий в загрязненной акватории.

В нашей работе исследование общей антирадикальной активности Cd-связывающих белков пищеварительной железы приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*, показало, что иссле-

дуемые белки способны поглощать кислородные радикалы, а, следовательно, являются одним из механизмов антиоксидантной защиты в приморском гребешке. Снижение уровня TOSC исследуемых металлсвязывающих белков у неполовозрелого гребешка можно рассматривать как механизм адаптации к условиям изменяющейся окружающей среды.

Литература

Bustamante P., Miramand P. Interspecific and geographical variations of trace element concentrations in Pectinidae from European waters // *Chemosphere*. 2004. Vol. 57. P. 1355–1362.

Camus L., Pampanin Daniela M., Volpato E., Delaney E. Sanni S., Nasci C. Total oxyradical scavenging capacity responses in *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the Venice lagoon (Italy) to measure the biological impact of anthropogenic activities // *Mar. Poll. Bull.* 2004. Vol. 49. P. 801–808.

Chelomin V. P., Bobkova E. A., Lukyanova O. N. and Chekmasova N. M. Cadmium-induced alterations in essential trace element homeostasis in the tissues of scallop *Mizuhopecten yessoensis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 110C. No. 3. P. 9–12.

Dallinger R., Berger B., Hunziker P.E., Birchler N., Hauer C. R. and Jeremias H. R. Kagi. Purification and primary structure of snail metallothionein. Similarity of the N-terminal sequence with histones H4 and H2A // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 216. P. 739–746.

Giguere A., Coulliard Y., Campbell P. G.C., et al. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient // *Aquatic Toxicology*. Vol. 64. 2003. P. 185–200.

Jin-Sung Park, Soohye Chung, Il-Seon Park, Yangsun Kim, Chul-Hwan Koh, In-Sook Lee. Purification and characterization of metallothionein-like cadmium-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2002. Vol. 131. P. 425–431.

Julshamn K., Andersen K.-J. Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed mollusks in western Norway-I. The distribution and binding of cadmium, zinc and copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1983a. Vol. 75A. P. 9–12.

Kagi J. H. R. and Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein // *Experientia Suppl.* 1987. Vol. 52. P. 25–61.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

Mauri M., Orlando E., Nigro M., Regoli F. Heavy metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Mar. Ecol. Prog.* 1990. Vol. 67. P. 27–33.

Muller T., Schuckelt R. and Jaenicke L. Evidence for Radical Species as Intermediates in cadmium/Zinc – Metallothionein – dependent DNA Damage *IN VITRO* // *Environmental Health Perspective*. 1994. Vol. 102. Supplement 3. P. 27–29.

Ramana Kumari M. V., Hiramatsu M. and Ebadi M. Free radical Scavenger Actions of Metallothionein Isoforms I and II // *Free Rad. Res.* 1998. Vol. 29. P. 93–101.

Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Proteggente Anna, Pannala Ananth, Yang Min, and Rice-Evans Cathrine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // *Free Radical Biology & Medicine*. 1999. Vol. 26. Nos. 9/10. P. 1231–1237.

Roesijadi G., Fowler B. A. Purification of invertebrate metallothioneins // *Methods in Enzymology*. 1991. Vol. 205. P. 263–273.

Stone H. C., Wilson S. B and Overnell J. Cadmium-binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization // *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 85C. No. 2. P. 259–268.

Viarengo A., Palmero S., Zanicci G., Capelli R., Vaissiere R. and Orunesu M. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* // *Mar. Env. Res.* 1985. Vol. 16. P. 23–36.

Viarengo A., Burlando B., Cavaletto M., Marchi B., Ponzano E. and Blasco J. Role of metallothionein against oxidative stress in mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 227. P. 1612–1619.

Viarengo A., Canesi L., Massu-Cotelli A., Ponzano E., Orunesu M. Cu, Zn, Cd content in different tissues of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* (Smith 1902): role of metallothionein in the homeostasis and in the detoxification of heavy metals // *Mar. Env. Res.* 1993. Vol. 35. P. 216–217.

Zapata-Vivenes E., and Nusetti O. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis* // *Journal of Shellfish Research*. August 1. 2007.

Zhukovskaya A. F., Belcheva N. N., Chelomin V. P. Adaptation biochemical mechanisms to cadmium in the far eastern scallop *Mizuhopecten yessoensis* / *Physiomer* 08: abstr. 2008. Brest. France. 1–4 September. P. 86.

Никаноров А. М., Жулидов А. В., Покаржевский А. Д. Биомониторинг тяжелых металлов в пресных экосистемах // Л.: Гидрометеиздат, 1985. 144 с.

**ASSESSMENT OF FEATURES IN BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION
OF YOUNG GROWTH SCALLOP *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS***

A.F. Zhukovskaya, V.P. Chelomin

*V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute of Far Eastern Branch Russian Academy of Sciences, Vladivostok,
Russia,*

e-mail: avianna@poi.dvo.ru

A feature biochemical mechanism of cadmium adaptation was studied in age-1⁺ scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia). Total cadmium was found to be associated with three high molecular weight MT-like proteins. A novel cadmium-binding protein was revealed in digestive gland of age-1⁺ scallop *M. yessoensis*. In present time this new high molecular weight (120 kDa) protein has not been detected in adult (5–7 ages). The existence of two proteins 43 and 72 kDa molecular weight cadmium-

binding proteins also was founded. Total oxyradical scavenger capacity (TOSC) was investigated for cadmium-binding proteins identified in digestive gland of *M. yessoensis*. The means of TOSC were compared between control and experimental groups (CdCl₂ 300 mcg/l) of scallops *M. yessoensis*. The putative biological significance of the features in biochemical mechanism of cadmium adaptation in young growth scallops *Mizuhopecten yessoensis* is discussed.

ПОПУЛЯЦИИ КАСПИЙСКОГО ТЮЛЕНЯ

В. Ф. Зайцев, Э. И. Мелякина, Л. Ю. Ноздрин

ФГОУ ВПО Астраханский Государственный Технический Университет, г. Астрахань, Россия,
e-mail: post@astu.org, http://www.astu.org

Каспийский тюлень – это единственное морское млекопитающее на Каспии, уникальный эндемичный вид, который занесен в Красную книгу Международного Союза охраны природы как вид, находящийся под угрозой. Тюлень является вершиной трофической пирамиды на Каспии, и состояние этой популяции может служить индикатором благополучия всей экосистемы большого региона.

Тюлень, обитающий в Каспийском море, является единственным живущим здесь морским млекопитающим. В нашей стране обитают два вида из подрода кольчатых нерп, и каспийский тюлень (*Phoca caspica*) — один из них, обитающий во внутренних водах (второй вид — это байкальская нерпа *P. sibirica*).

Географическое распространение каспийского тюленя ограничено Каспийским морем. Это подтверждает его автохтонное происхождение. Животные встречаются по всему Каспию, от прибрежных районов Северного Каспия до берегов Ирана, как в очень мелководных районах, так и в зоне больших глубин.

Как у всех полуводных животных, стадии размножения и питания резко дифференцированы. Каспийский тюлень биологически связан со льдами, на которых размножается, выкармливает детенышей и линяет. Ареал размножения обуславливается ледовитостью и может варьировать в зависимости от льдообразования в западной или восточной части Северного Каспия. Нагульный ареал ежегодно изменяется, в зависимости от распределения пищевых организмов, килек.

Каспийский тюлень каждый год предпринимает перемещения с севера на юг в конце весны и обратно с юга на север в начале осени. Животные мигрируют большей частью разреженными многочисленными группами. Постоянных путей к югу и назад на север, вероятно, не существует.

Предпочитает держаться в области умеренно-холодных вод, поверхностная температура

которых не превышает 20 °С. Способен выдерживать прогрев воды до +25–30 °С в летнее время. Зимой нормально существует при любой минусовой температуре (пагетодный вид).

Животные перемещаются в поверхностном слое воды. Встречаются как в мелководной части Северного Каспия, так и в глубоководных районах Среднего и Южного Каспия (до 100-метровой изобаты). Способны при добывании пищи погружаться на глубину до 80 м.

Увеличение глубин, в связи с подъемом уровня моря, в последние годы сказалось на использовании временных убежищ тюленя – ледовых и островных станций. Островные лежбища в Южном Каспии значительно сократились, а комплекс шалыг (затопляемых островов) на восточном мелководье Северного Каспия, который в предзимний период принимает большую часть популяции, периодически меняет свою конфигурацию и расположение (из-за изменения глубин моря).

С увеличением глубин в ранее традиционных районах зимних залежек тюленя (банки Ракушечная, Большая Жемчужная и Кулалинская) сделалось невозможным образование полей льда с торосами и стамухами, предотвращающими динамическое воздействие среды на залежки приплода. Ареал размножения тюленя постепенно переместился в северо-восточные районы Северного Каспия, где глубины в настоящее время не превышают 5 м.

В современный период каспийский тюлень сталкивается с многочисленными угрозами. Чрезмерная эксплуатация популяции тюленя промыслом в прошедшем столетии привела к существенному сокращению численности популяции, сокращению и исчезновению мест обитания из-за усиливающейся антропогенной нагрузки и аномально теплых зим подрывает возможность достижения популяцией тюленя стабильного уровня развития. Виды-вселенцы, болезни, загрязнение и другие

факторы не способствуют устойчивому состоянию популяции вида. В таких условиях необходима как можно более точная оценка текущего размера популяции и количества самок, принимающих участие в размножении. Это является необходимым условием для реализации плана действий по охране каспийского тюленя и для оценки возможных последствий влияния факторов, представляющих угрозу для этого вида (Сокольский А. Ф. и др., 1998).

Предполагается, что каспийские тюлени имели высокую численность популяции – около 1 миллиона особей в конце XIX столетия. Однако вид был объектом интенсивной охоты в течении всего XX века и как предполагается был «угнетаемым» видом.

Современная численность каспийского тюленя является результатом долговременного спада за последние 100 лет. Основным фактором спада был хищнический промысел, который вызвал быстрое снижение числа тюленей в середине 1960-х. Хотя коммерческая охота была официально закрыта в 1996 г., с тех пор происходит ежегодная добыча для «научных целей» (Sokolskii A. F., 2004). Кроме того, на спад численности повлияли низкие показатели плодовитости.

Исследования этих лет ставили перед собой важную задачу определения причин массовой гибели каспийских тюленей, случавшихся по всей акватории Каспийского моря в 1997, 2000 и 2001 гг. Наиболее крупный выброс туш мертвого тюленя на островах по северу моря и на его побережье наблюдался в 2000 г., когда погибло по одним данным более 20000 животных, по другим – до 30000. Дальнейшие исследования выявили, что основной причиной гибели стала вспышка заболевания – чума плотоядных. Однако столь массовую гибель спровоцировало прежде всего сочетание неблагоприятных экологических условий в периоды размножения и линьки и высокий уровень токсичных загрязнений.

Бактериологические и вирусологические исследования в 1997 году показали, что в мозгу мертвых каспийских тюленей содержится новый штамм вируса собачьей чумки, так называемой CDV. Он же послужил причиной массовой смертности тюленей в 2000 году. Анализ результатов эпидемиологических исследований тюленей из северо-западного Каспия за 1993–1998 гг. позволили предположить, что CDV был неактивной формой до 1997 г. Многолетние данные с 1978 года показывают, что уровень смертности тюленей примерно постоянен на протяжении больших промежутков времени, но

каждые несколько лет происходит резкое увеличение смертности (Eybатов et al., 1997).

У каспийского тюленя в тканях тела отмечается накопление нефти и ее фракций. Принято считать, что тюлени являются наиболее чувствительными к нефтяному загрязнению животными изо всех организмов морской биоты. Изолирующие функции наружных покровов нарушает даже очень кратковременный контакт с нефтепродуктами и нередко заканчивается гибелью тюленей.

Большой урон популяции каспийского тюленя помимо нефтеуглеводородов оказывают пестициды и тяжелые металлы. Считается, что именно их повышенная концентрация в воде Каспийского моря послужила толчком к гибели морского зверя в апреле 2000 года. На востоке Северного Каспия в районе Зюйд-вестовой шалыги началась массовая гибель тюленей, в основном это были неполовозрелые особи.

Патологоанатомические исследования показали, что у 70% животных имелись нарушения иммунной системы (Иванов В. П., Сокольский А. Ф., и др., 2000). Токсикологический анализ выявил значительные уровни накопления хлорорганических пестицидов и тяжелых металлов в тканях и органах погибших особей, что говорило о хроническом токсикозе животных, ведущему к ослаблению иммунитета и провоцированию заболеваний.

Так же по данным исследований в популяции каспийского тюленя диагностировано заболевание сложной комбинированной инфекцией – бактериальными пастереллезом и сальмонеллезом в сочетании с вирусной инфекцией – чумой плотоядных. При этом последняя является основной причиной гибели животных, тогда как бактериальные заболевания развиваются как вторичные инфекции.

Толчком к развитию заболеваний в 2000 году могли послужить крайне неблагоприятные условия зимы. Существенно сокращенный период ледостава превысил экологические пределы существования вида. Линька животных происходила в условиях большой скученности на шалыгах, расположенных вдоль восточного побережья, периодическое затопление которых под влиянием нагонов усугубляло плохое состояние линяющих тюленей. Высокая концентрация тюленей на островных привело благоприятным условиям для зарождения эпидемии и скорого распространения инфекции в чрезмерно уплотненной популяции, находившейся, кроме того, в ослабленном состоянии (Захарова Н. А., 2003).

С 1996 года каспийский тюлень входит как «уязвимый» вид в список Международного союза охраны природы (IUCN). Статус каспийского тюленя был заново оценен в 2006 г. в связи с

пересмотром критериев для внесения в список «уязвимых» видов в 2001 г. и вид по прежнему входит в группу «угрожаемых» (treatment) видов и относится к «уязвимым» (vulnerable).

Литература

Захарова Н. А., Уровень накопления и влияние ряда токсикантов на состояние популяции каспийского тюленя: Дис. канд. биол. наук: 03.00.32: Астрахань, 2003. – 129 с.

Иванов В. П., Сокольский А. Ф. Научные основы стратегии защиты биологических ресурсов Каспийского моря от нефтяного загрязнения. – Астрахань: издательство КаспНИРХа, 2000. – 180 с.

Сокольский А. Ф., Хураськин Л. С., Почтовая Н. А., Кузнецов В. В., Валедская О. В. Промысловый запас и состояние популяции тюленя

в Волго-Каспийском бассейне // Рыбохозяйственные исследования на Каспии. – Астрахань, 1998. – 99–115 с.

Eybatov T. M. Caspian seal mortality in Azerbaijan. In: Dumont H, Wilson S, Wazniewicz B (eds) Caspian environmental program (Proceedings from the First Bio-Network Workshop). World Bank, Bordeaux, 1997. p 95–100.

Sokolskii A. F. Monitoring of seal population condition in Kazakhstani sector of Northern Caspian. Report to Agip KCO on scientific research work. – Astrakhan, 2004. p. 45–50.

REASONS FOR LOWERING THE CASPIAN SEAL POPULATION

V.F. Zaitsev, E.I. Melyakina, L.Y. Nozdrina

*Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russia,
e-mail: post@astu.org*

The Caspian seal – this is the only marine mammal in the Caspian Sea, a unique endemic species, which is listed in the Red Book of the International Union of Conservation as a species under threat. Seal is the top of the food pyramid on the Caspian, and the status of this population may serve as an indicator of well-being of the entire ecosystem of a large region.

Seals living in the Caspian Sea, is the only living here marine mammals. In our country, two species of the subgenus ringed seals, and the Caspian seal (*Phoca caspica*) – one of them, living in inland waters (the second type – a Baikal seal *R. sibirica*).

Geographic distribution of Caspian seals is limited to the Caspian Sea. This confirms the autochthonous origin. Animals found around the Caspian Sea from the coastal areas of the Northern Caspian to the shores of Iran, both in very shallow areas, and in the zone depths.

Like all aquatic animals, habitats for breeding and feeding sharply differentiated. The Caspian seal biologically linked with the ice, which multiplies, nurses pups and molt. The area of breeding is caused by ice coverage and may vary depending on the ice formation in the western or eastern part of the Northern Caspian. Feeding grounds each year varies, depending on the distribution of food organisms, sprats.

Caspian seals each year, making travel from north to south in the late spring and back south to north in the early autumn. Animals migrate for the most part

sparse small groups. Permanent routes to the south and back north, probably does not exist.

Prefers to stay in the area of moderately cold water, the surface temperature not exceeding 20 ° C. Able to withstand the heating water up to +25–30 ° C in summer. In winter, normally exists in any sub-zero temperatures (pagetodny view).

Animals are moved into the surface layer of water. Found both in the shallow part of the Northern Caspian and in the deep areas of the Middle and Southern Caspian Sea (up to 100 – meter isobath) are capable of obtaining food with dive to a depth of 80 m.

The increase in depth due to sea-level rise, in recent years affected the use of temporary shelters seal – ice and island stations. Island rookery in the southern Caspian Sea has decreased significantly, and the complex shalyg (flooded islands) on the eastern shallows of the North Caspian, which is in the early winter period, a large part of the population that periodically changes its shape and location (due to changes in the depths of the sea).

With increasing depth in the earlier parts of the winter conventional harp seal (banks Rakushechnaya, Big and Pearl Kulalinskaya) made it impossible for the formation of fields of ice hummocks and grounded hummocks that prevent the dynamic effects of environment on the offspring aggregations. The area of breeding seal gradually shifted to the north-eastern regions of the Northern Caspian, where the depth at present do not exceed 5 m.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА КАРДИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ РЕФЛЕКСЫ У МОЛЛЮСКОВ

Н. Н. Камардин, Е. Л. Корниенко, Г. П. Удалова, С. В. Холодкевич

Учреждение Российской Академии наук Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Центр
экологической безопасности РАН, г. Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: nik-kamardin@yandex.ru

С помощью метода электронной микроскопии показано сходство структур осфрадия у четырёх видов гастропод (сем. Viviparidae, Lymnaeidae и Littorinidae). Рецепторы осфрадиев являются первичной мишенью, реагирующей на химические вещества, в частности на ионы тяжёлых металлов. Выявлены изменения электрофизиологических реакций нейронов осфрадия при действии ионов тяжелых металлов (Cu, Cd). Нейроны осфрадия связаны с ганглиями ЦНС, которые, в свою очередь иннервируют сердце моллюсков. Существенной частью настоящей работы составляло исследование функциональных связей сердца моллюска с рецепторами осфрадия, реагирующими на химические вещества. Показаны изменения ЧСС при действии ионов тяжёлых металлов у интактных моллюсков *Littorina littorea* и после экстирпации осфрадия. Полученные результаты могут быть существенны для понимания нервных механизмов и путей, посредством которых ионы тяжёлых металлов влияют на сердечную активность. Они важны и потому, что ЧСС используется как демонстративный физиологический биомаркер для оценки физиологического состояния водных беспозвоночных, а также качества воды.

Введение

В настоящее время в экотоксикологических исследованиях в качестве биомаркера довольно широко применяется регистрация кардиоактивности декапод (Depledge et al., 1996; Холодкевич, 2007), а также моллюсков: двустворчатых и гастропод (Brown et al., 2004; Chelazzi et al., 2004; Santini et al., 2000; De Pirro, 2004; Romero, Hoffmann, 2008; Холодкевич и др. 2009). Хронотропные характеристики сердечных сокращений оказались достаточно информативными для

оценки функционального состояния указанных беспозвоночных как в нормальных условиях их существования, так и при действии токсических веществ, в том числе соединений тяжёлых металлов (ТМ) (Styrishave et al. 1995; Камардин и др. 2009, Холодкевич и др. 2009). Очевидно, что если в экотоксикологических исследованиях регистрации частоты сердечных сокращений (ЧСС) может быть достаточно для анализа ответной реакции со стороны кардиосистемы на внешнее химическое воздействие, то для понимания физиологических механизмов, протекающих при этом в организме, необходимо проследить нейрогормональные процессы в разных звеньях хемосенсорной системы, а также в нервных путях, связывающих её с кардиосистемой.

В настоящей работе предпринята попытка использования кардиоактивности как биомаркера у водных моллюсков *Littorina littorea* при загрязнении воды соединениями тяжёлых металлов. В задачу исследования входило также выявление возможного участия в ответных реакциях кардиосистемы осфрадия моллюсков, т.е. первичной мишени, на которую оказывают влияния ионы ТМ.

Материалы и методы

Морфологические исследования осфрадиев проводили на изолированных препаратах пресноводных моллюсков *Viviparus sp.*, *Lymnaea stagnalis* и морского беломорского моллюска *Littorina littorea*, а так же *Littorina angulifera*, используя трансмиссионную и сканирующую электронную микроскопию.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Выделенные из животных осфрадии фиксировали традиционными методами в 1%-ном растворе OsO₄ и 2,5%-ного глутарового альдегида. Серий-

ные срезы изготавливали на ультратоме LKB-III и окрашивали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (Уикли, 1975). Смонтированные на блендах три-четыре последовательных среза просматривали на микроскопах Tesla BS-613 или Hitachi H-300.

Сканирующая электронная микроскопия. Препараты осфрадиев готовили обычными методами и просматривали с помощью электронного микроскопа Jeol T-200.

Нейрофизиологические методы изучения осфрадиев.

Осуществляли запись токов осфрадиальных нейронов *Lymnaea stagnalis* в конфигурации «целая клетка» (Hamill et al., 1981). В условиях фиксации тока импульсы записывались на чернилопишущем регистраторе Gould-Brush. Регистрировали медленные суммарные потенциалы рецепторной поверхности осфрадиев моллюсков *Viviparus sp.* с помощью электродов сравнения, предназначенных для рН-метра РН-340 и имеющих собственное сопротивление порядка 15 кОм. В нейрофизиологических опытах в качестве раздражителей использовали растворы L-глутаминовой аминокислоты и L-аспартата.

Регистрация кардиоактивности моллюсков. Записывали ЧСС переднежаберных моллюсков *Littorina littorea*, собранных на сублиторали Чупинской гупы Кандалакшского залива Белого моря. Животных сначала 3–4 недели акклиматизировали в лабораторных условиях в искусственной морской воде с соленостью 26,0 ‰ при постоянной температуре $11 \pm 0,3^\circ\text{C}$ и 24-часовом постоянном освещении (люминесцентная лампа в 60 Вт). Кардиоактивность регистрировали, используя оригинальный неинвазивный автоматизированный метод записи в режиме on-line (Холодkevич и др. 2007). Характеристики кардиоактивности обрабатывали статистически с помощью программы Статистика 6.0. В качестве токсических воздействий применяли соединения меди: CuSO_4 (0,2, 0,3, 0,5, 1,0 и 5,0 мг/л) и кадмия: CdCl_2 (0,3, 1,0 и 5,0 мг/л). Растворы вводили шприцом через катетер непосредственно в мантийную полость моллюска, свободно передвигавшегося в аквариуме. Всего сделано более 40 проб. Проводили ряд опытов на моллюсках с удалённым осфрадием. Для этого литорин наркотизировали, инъецируя в ногу 1,0 мл 20%-ный раствор $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ на дистиллированной воде, и после их обездвиживания осфрадий экстирпировали под контролем бинокулярного микроскопа МБС-9. В других экспериментах в аквариуме с моллюсками устанавливали повы-

шенное содержание ионов меди за счёт добавления CuSO_4 . Суммарная концентрация меди в аквариуме оказалась равной 45,5 мг/л, что было несколько выше обнаруженной в природных условиях (концентрация ионов меди в загрязнённых точках Кандалакшского залива Белого моря может достигать 30,0 мг/л). У моллюсков определяли способность к аккумуляции за 26 суток ионов Cu^{2+} с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра С-117-М 1. Контролем служили моллюски, находившиеся в чистой морской воде при прочих сходных условиях.

Результаты

По нашим данным, наиболее простое строение имеют осфрадии у представителей семейств Viviparidae и Littorinidae (Gastropoda, Prosobranchia). Обычно это уплощенный валик, образованный однослойным цилиндрическим эпителием (рис. 1, А). Центральную часть валика занимает рецепторная зона, а по его бокам располагаются две мерцательные зоны, сформированные ресничными клетками (рис. 1, Б).

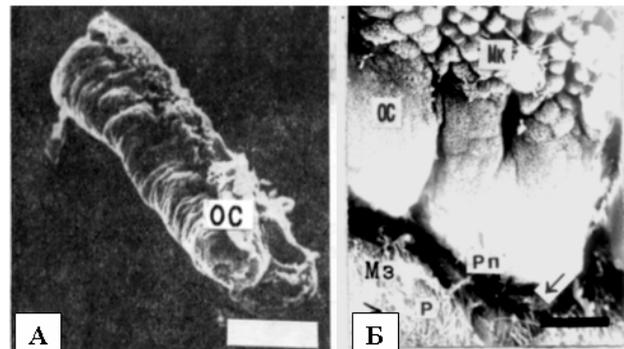


Рис. 1. А – внешний вид осфрадия моллюска *Viviparus sp.*; Б – ультраструктурная организация поверхности осфрадия моллюска *Littorina littorea*

Обозначения: ОС – осфрадий, Мк – мерцательная клетка, Мз – зона мерцательных клеток, Рп – рецепторная поверхность, Р – реснички. Масштаб: 1 мкм

Особую роль в рецепции играют небольшие пограничные участки осфрадиальной поверхности, имеющие вид щели или небольшого желобка и располагающиеся между ресничной и рецепторными зонами (рис. 2, А, В). Микроворсинчатые опорные клетки латеральных зон осфрадия в области щели обладают широкими цитоплазматическими выростами – «воротничками» с высотой до двух мкм. Плотнo сомкнутые «воротнички» изолируют от окружающей среды небольшое пространство, заполняемое микро-

ворсинками и короткими видоизмененными цилиями рецепторных клеток (рис. 2, Б, Г). Округлые или веретеновидные тела рецепторных клеток располагаются в рецепторной зоне ближе к базальной мембране и имеют дифференцированные центральный и периферический отростки (рис. 2, А). Рецепторная зона имеет ровный рельеф с пучками ресничек одиночных ресничных клеток. Цилии хемосенсорных клеток располагаются в слое микроворсинок опорных клеток и лишены корешков (рис. 2, Б).

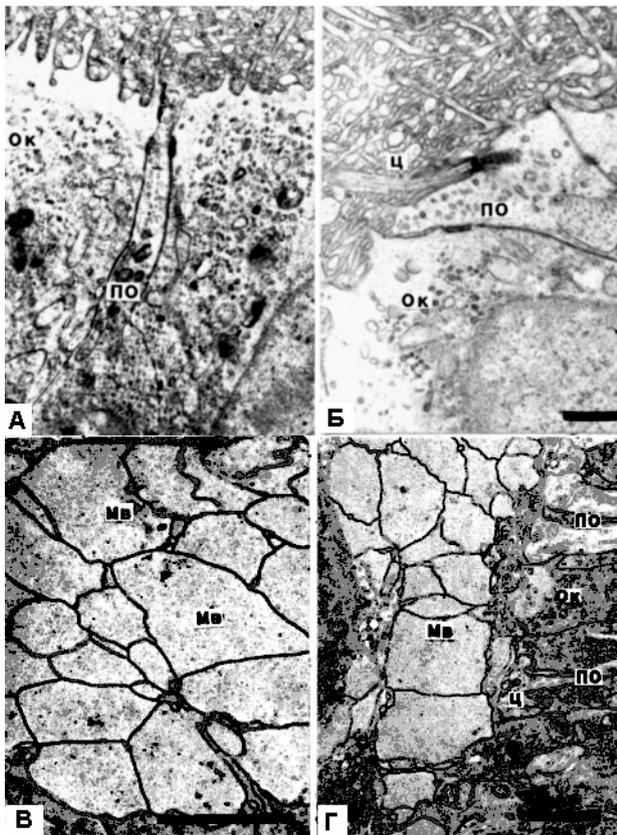


Рис. 2. Ультраструктурная организация рецепторной и щелевой зон моллюска *Littorina littorea*. Рецепторная клетка (А), видоизменённые реснички (цилии) периферических отростков рецепторных клеток (Б), ультраструктура микроворсинчатых опорных клеток зоны щели (В, Г). Масштаб: 1 мкм

Обозначения: Рк – рецепторная клетка, ПО – периферический отросток рецепторной клетки, Ок – опорная клетка, Ц – цилия, Бт – базальное тело реснички, Мв – микроворсинка, ПГ – пигментная гранула. Масштаб: 1 мкм.

Известна (Croll, 1983) чувствительность моллюсков к аминокислотам, поэтому в электрофизиологических опытах нами регистрировались ответы осфрадия живородки (*Viviparus* sp.) на раствор L-глутаминовой аминокислоты (10^{-4} моль/л), апплицированный на его поверх-

ность. В ответ на это воздействие возникал суммарный рецепторный потенциал (СРП) поверхности осфрадия, представлявший собой волну деполяризации длительностью до 40 секунд и амплитудой более 100 мкВ (рис. 3, I, А). При последующем трехминутном воздействии ионов меди в концентрации 4,0 ммоль/л амплитуда СРП на раствор L-глутаминовой аминокислоты снижалась в среднем на 51% (рис. 3, I, Б). Это указывало на прямое влияние меди на рецепторные процессы в осфрадии.

Нейроны препарата осфрадия прудовика отвечали реакцией возбуждения на аппликацию L-аспартата в концентрации 10^{-5} моль/л. Трёхминутная перфузия осфрадия раствором хлористого кадмия (4,0 ммоль/л) приводила к модификации этой реакции (рис. 3, II).

Записывая кардиоактивность морского моллюска *Littorina littorea* неинвазивно с помощью прикрепленных к раковине датчиков получили следующие результаты. До применения соединений меди или кадмия ЧСС равнялась в среднем для выборки $18 \pm 2,3$ уд/мин, при этом наблюдались индивидуальные колебания величины ЧСС. Инъекции в мантийную полость через катетер 1 мл морской воды с растворами соединений Cd или Cu вызывали увеличение частоты сердечных сокращений, причём наблюдался дозозависимый эффект (рис. 4, I, II). Величина приращения ЧСС составляла 2–7 ударов в минуту и зависела от концентрации инъецированного раствора ТМ. Латентный период реакции колебался от 3 до 5 минут. Длительность реакции зависела от концентрации и в случае с 5,0 мг/л раствором меди могла достигать полутора часов (рис. 4, I, Г). При этом контрольные инъекции морской воды не вызывали достоверных изменений ЧСС (рис. 4, II, А).

Особое значение осфрадия литорин для проявления обнаруженной со стороны ЧСС реакции проявилось в опытах с его экстирпацией. Операция вызывала торможение двигательной активности моллюсков, однако уже через 2–3 суток она восстанавливалась: моллюски начинали ползать и питаться. При этом по сравнению с дооперационной величиной ЧСС возросла в 2 раза и составила 45,3 уд/мин (рис. 4, III, А) Можно предположить, что осфрадий у литорин оказывает постоянное тормозное воздействие на сердце, поэтому его удаление приводило к тахикардии. На вторые сутки, уже при восстановленной двигательной активности моллюска, но при высокой фоновой ЧСС, инъекция Cd^{+2} (5,0 мг/л) не вызвала заметного изменения ЧСС (рис. 4, III, А).

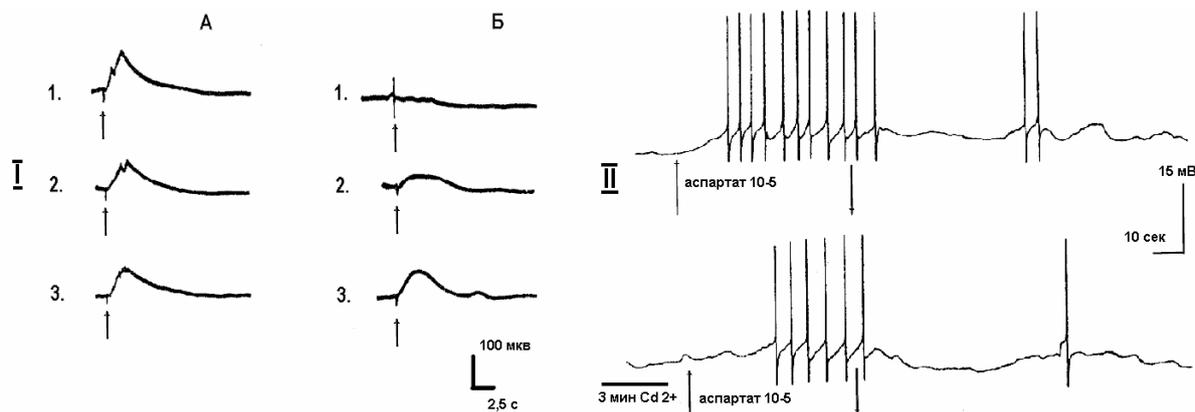


Рис. 3. I – Суммарные рецепторные потенциалы поверхности осфрадия моллюска *Viviparus* sp. в эксперименте с тремя последовательными аппликациями (1–3) L-глутаминовой аминокислоты (10^{-4} моль/л) (А) и тремя последующими, но при трёхминутного воздействия на осфрадий Cu^{2+} (4.0 моль/л) (Б). II-Регистрация «patch-clamp whole cell» в условиях фиксации тока рецепторных нейронов осфрадия прудовика при аппликации L-аспартата в норме (верхняя кривая) и после 10-ти минутной перфузии препарата ионами Cd^{2+} (1,0 мМ)

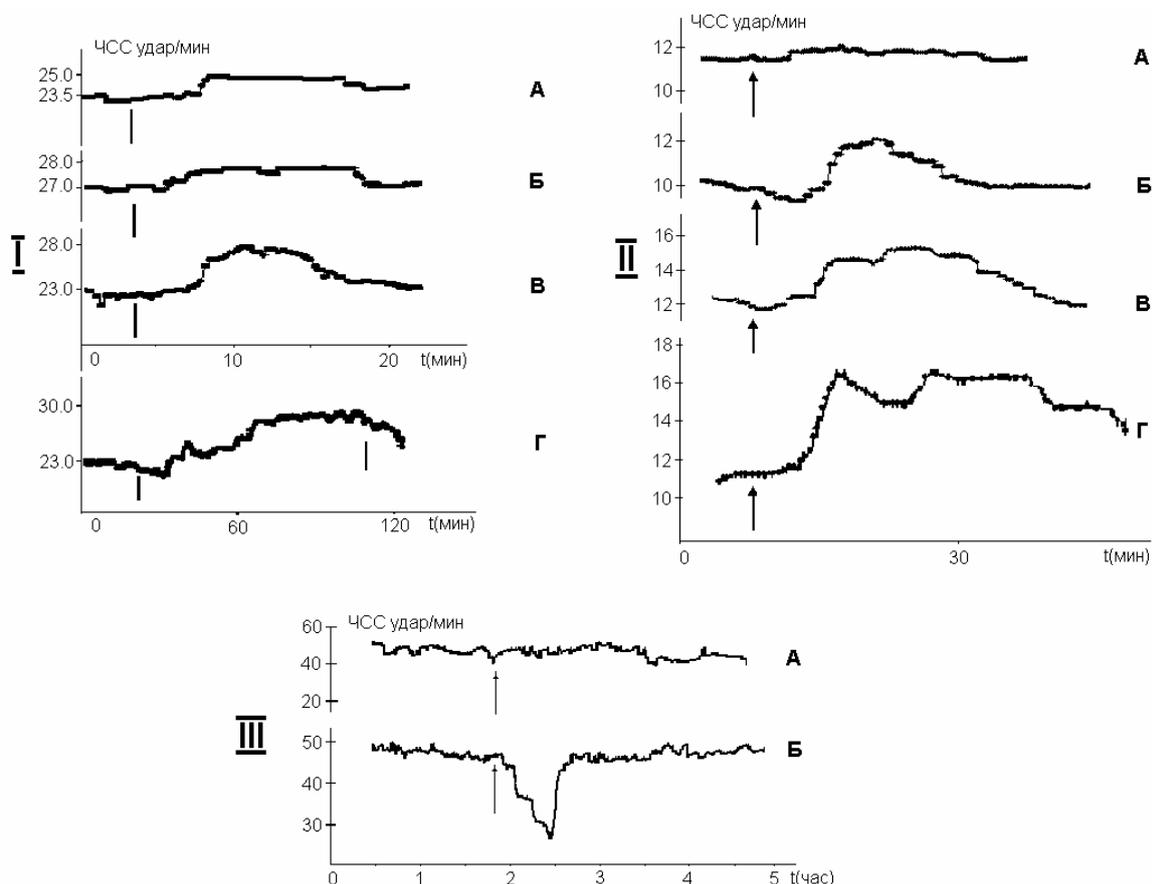


Рис. 4. Оригинальные записи изменения ЧСС моллюсков *Littorina littorea* в ответ на введение в мантийную полость воды с различными концентрациями солей меди или кадмия. I – Изменения ЧСС при действии растворов CuSO_4 : А, Б, В, Г – соответственно – 0,2, 300, 1000 и 5000 мг/л. Первая стрелка – момент начала инъекции, вторая – начало инъекции чистой морской воды. II – Изменения ЧСС при действии одинаковых объёмов чистой морской воды (А) и растворов CdCl_2 с концентрациями 0,5 мг/л (Б), 5,0 мг/л (В) и 5 мг/л (Г). Стрелка – момент начала инъекции. III – Запись ЧСС у моллюска с удалённым осфрадием при инъекции раствора CdCl_2 (5,0 мг/л) через двое (А) и пять (Б) суток после экстирпации. Стрелка – момент начала инъекции.

Однако на 5–7 сутки после экстирпации осфрадия, в ответ на инъекцию этого же раствора удалось зарегистрировать снижение ЧСС (рис. 4, III, Б). Возможно, за это время произошла, по крайней мере, частичная регенерация структур осфрадия и восстановление нервной проводимости от этого органа через структуры ЦНС до сердечной системы моллюска. Принципиальная способность структур осфрадиев к регенерации показана (Камардин, Ноздрачев, 2004).

В серии длительных, до 1,5 месяцев, наблюдений за кардиоактивностью литорин при пребывании их в морской воде с концентрацией Cu значительно более высокой (45,5 мкг/л), чем нормальной (для Белого моря это 3,0–5,0 мкг/л),

выявили уже на 3–5 сутки у большинства моллюсков небольшое, но достоверное увеличение ЧСС (рис. 5. I). На 5 сутки обнаружили также увеличение внутритканевой концентрации Cu^{2+} , которая превысила нормальную (18 мкг/г влажного веса.) на 17%. В течение последующих 26 дней наблюдалось дальнейшее увеличение (максимально на 22 день до 68 мкг/г) внутритканевой концентрации Cu^{2+} (рис. 5, II). Параллельно этому изменению внутритканевой концентрации меди шло постепенное возрастание ЧСС до 50–75% по сравнению с нормой (рис. 5, I). При замене загрязнённой воды на чистую морскую внутритканевая концентрация меди увеличивалась, в то время как ЧСС снижалась (рис. 5).

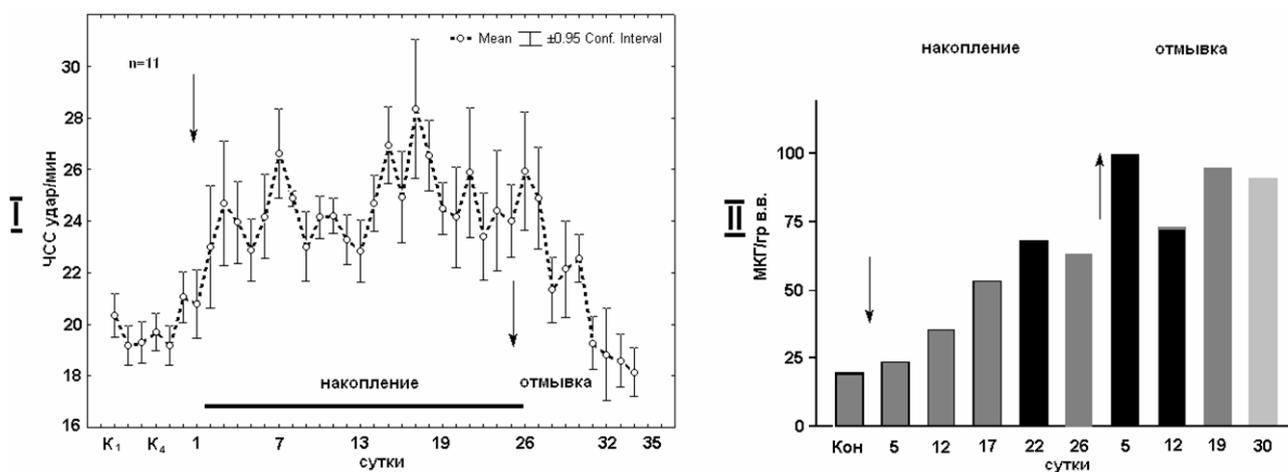


Рис. 5. I – Средние для выборки (n=11) моллюсков *Littorina littorea* значения ЧСС при нахождении животных в контрольной морской воде (K1 – K4) и в морской воде с раствором CuSO_4 с концентрацией 45,5 мг/л (1–36 суток). Указаны доверительные интервалы для подопытных моллюсков за конкретные сутки ($p \leq 0,01$). II – Содержание меди в тканях моллюсков *Littorina littorea* в мкг на грамм влажного веса в контроле (Кон) и во время длительной их экспозиции в морской воде с концентрацией CuSO_4 45,5 мг/л

Обсуждение результатов

В процессе эволюции у моллюсков сформировался специализированный сенсорный орган – осфрадий, реагирующий на изменение солёности, осмотического давления, гипоксию, гиперкапнию, аминокислоты и различные запаховые вещества. Обладая химической мультисенсорностью, осфрадий участвует в регуляции широкого спектра физиологических и поведенческих реакций, в том числе дыхания, питания, реакции избегания хищника, хоминга. При загрязнении среды обитания моллюсков, в частности ТМ, возможны неблагоприятные для организма изменения указанных реакции. При этом первой мишенью действия различных химических веществ являются периферические рецепторные осфради-

альные органы. У большинства представителей классов Mollusca осфрадий находится в мантийной полости в непосредственном контакте с водной средой (Камардин, Ноздрачев, 2004). Исследование ультраструктуры осфрадиев прудовика, живородки и литорин выявило их сложную рецепторную природу. До сих пор, однако, немного работ, посвященных воздействию ТМ на рецепторные клетки осфрадия. Так, показано негативное влияние HgCl_2 (10–20 мкМ/л) на электровозбудимые Ca^{2+} входные токи ганглиозных клеток и выходные электровозбудимые K^+ токи сенсорных клеток осфрадия прудовика (Kamardin et al., 1999). На ионы ТМ эти нейрональные структуры реагируют, благодаря свойственной им возбудимости и наличию разнообразных каналов, рецепторов, а также ион – канал – рецепторных ком-

плексов (S-Rozsa, Salanki, 1990; Riss, Osipenko, 1994). В идентифицированных нейронах ЦНС лёгочных моллюсков наблюдали в ответ на действие ТМ и различных медиаторов изменение импульсной активности, а также Na^+ и K^+ мембранных токов (Szucs et al. 1994). В наших электрофизиологических опытах приведены данные о тормозном влиянии трехминутного воздействия ионов Cu^{2+} на суммарный рецепторный потенциал (СРП) осфрадиальной поверхности живородки, а также влияние ионов Cd^{2+} на импульсную активность рецепторных клеток осфрадия. Некоторые из исследованных клеток осфрадия могут являться важными регуляторными элементами кардиореспираторной системы моллюсков (Winlow, Syed, 1992; Сафонова и др., 2008). По-видимому, через систему рецепторных клеток осфрадия, нервных путей и нейронов ЦНС реализуются ответные реакции кардиосистемы моллюсков на химические раздражители, в том числе и ТМ.

Непосредственное воздействие ионов ТМ на рецепторы осфрадия вызывает изменение текущих электрических процессов в этих органах, что в свою очередь посредством активации ганглиев ЦНС и регуляторных нейрогормональных процессов влияет на деятельность физиологических систем организма, в частности, как это показано в данном исследовании, на работу сердца. Это отчётливо проявилось в хронических экспериментах с регистрацией ЧСС литорин, находившихся в чистой воде или в загрязнённой соединениями меди. У интактных моллюсков кратковременная инъекция ионов меди или кадмия в мантийную полость приводила к увеличению ЧСС, причём наблюдался дозозависимый эффект. Нарушение периферического звена хемосенсорной системы, в результате экстирпация осфрадия, привело к повышению ЧСС почти в 2 раза. По-видимому, в рефлекторной хемосенсорной системе (осфрадий-ЦНС-сердце) резко снизились тормозные влияния на сердце. На 2–3 сутки инъекция Cd^{2+} в мантийную полость не вызвала изменения ЧСС. Существенно, что на 5–7 сутки после удаления осфрадия в ответ на инъекцию кадмия было зарегистрировано снижение ЧСС. Это указывало на восстановление центральной регуляции кардиосистемы, возможно, в результате регенерации рецепторов осфрадия. Снижение, а не повышение ЧСС (как до операции), можно объяснить предельно высокими для моллюска фоновыми значениями ЧСС.

Хроническое пребывание (до полутора месяца) литорин в воде с высокой концентрацией

ионов меди вызвало увеличение ЧСС и возрастание внутритканевой концентрации Cu^{2+} . Тахикардия была обусловлена, по-видимому, не только воздействием повышенной концентрации меди на периферическое звено хемосенсорной системы (рецепторы осфрадия), но и непосредственным воздействием ТМ на нейроны ЦНС. Обнаруженная нами тахикардия при воздействии ТМ (в острых и хронических опытах), указывает на активизацию катехоламиновой системы регуляции. Увеличение ЧСС могло быть одним из механизмов детоксикации, так как оно способствует усилению фильтрационной способности гемолимфы в полости сердечной сумки, адсорбции ТМ в почечном эпителии и их последующим выведением из организма. Процессы биохимической детоксикации организма моллюска состоит в переводе меди из активной (токсической) и растворенной в гемолимфе ионной формы в менее биологически активную, связанную с металлотионеинами и/или окруженную биомембранами. (Hispard et al., 2008). Наблюдавшееся нами увеличение количества меди в тканях литорин в первые недели отмывки можно объяснить возрастающим уровнем низкомолекулярных тионеиноподобных белков, связывающих растворимый пул меди и снижающий концентрацию активной формы Cu^{2+} (Talbot, Magee, 1978). Постепенная нормализация ЧСС только к 10 дню отмывки происходила, вероятно, за счёт уменьшения концентрации Cu^{2+} в гемолимфе.

Итак, проведённые нами эксперименты позволяют считать доказанной связь периферического рецепторного органа (осфрадия) с нейрогуморальной системой регуляции сердца моллюсков. На появление в воде ТМ в периферическом звене хемосенсорной нервной системы изменяются текущие сенсорные (электрические) реакции, что может служить сигналом к запуску кардиорегуляторных возбуждающих механизмов, осуществляемых через ганглии ЦНС. Поступление ТМ в гемолимфу приводит к модуляции нервных и медиаторных процессов и возникновению физиологических и биохимических механизмов детоксикации. Одним из путей детоксикации является усиление кардиоактивности.

Выводы

Проведено морфофизиологическое исследование осфрадиев брюхоногих моллюсков с целью выяснения влияния периферической хеморецепции на кардиоактивность.

Полученные результаты являются физиологическим обоснованием для использования метода неинвазивной регистрации в реальном времени кардиоактивности моллюсков, являющейся весьма демонстративным физиологическим биомаркером при проведении исследований, направленных, с одной стороны, на определение функционального

состояния гидробионта, а, с другой стороны, на оценку степени загрязнения пресноводной и морской воды соединениями тяжёлых металлов.

Работа выполнена при поддержке средств гранта РФФИ № 08-04-92424-BONUS_a, а также гранта РФФИ № 10-05-00875

Литература

Камардин Н. Н., Кузнецова Т. В., Холодкевич С. В. и др. Биоиндикация загрязнения поверхностных вод Белого моря тяжёлыми металлами на основе биомаркеров кардиоактивности брюхоногих моллюсков // Экологическая безопасность. 2009. № 1–2 (21–22). С. 61–64

Камардин Н. Н., Ноздрачев А. Д. Осфрадальные сенсорные системы моллюсков. 2004. СПб. 172 с.

Сафонова Т. А., Журавлев В. Л., Ноздрачев А. Д. Кардиореспираторная система моллюсков: структура, функции, механизмы регуляции. СПб Университет., 2008, 244 с.

Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. 1975. М. 324 с.

Холодкевич С. В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. № 16 (4). С. 223–232.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Иванов А. В., и др. Особенности движения створок и кардиоактивности двустворчатых моллюсков при действии различных стрессоров // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2009. Т. 45. № 4. С. 432–434.

Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers // Aquat. Toxicol., 2004/ Vol. 66. № 3. P. 267–278.

Chelazzi G., De Pirro M., Williams G.A. Different cardiac response to copper in limpets from metal polluted and clean shores of Hong Kong // Mar. Environ. 2004. Vol. 58. P. 83–93.

Depledge M.H., Lundebye A.K., Curtis T. et al. Automated interpulse-duration assessment (AIDA) a new technique for detecting disturbances, in cardiac activity in selected macroinvertebrates // Marine Biol. 1996. Vol. 26. P. 313–319.

De Pirro M. Ecophysiological responses to copper natural and anthropogenic extreme stressors, in marine mollusks. PhD thesis. Univ. Florence/ 2004. P. 1–299.

Hamill O.P., Marty A., Neher E et al. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell and cell-free membrane patches // Pflugers Arch. 1981. Vol. 391. P. 85–100

Haszprunar G. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. I. Gastropoda,

Prosobranchia // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1985. Vol. 307. P. 457–496.

Haszprunar G. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. III. Placophora and Bivalvia // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1987. Vol. 315. P. 37–61

Hispard f., Schuler D., de Vauflery A., et al. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* // Environ. Toxicol. Chem. 2008. № 27 (7). P. 1533–1542.

Kamardin N.N., Szucs A., S-Rozsa K. Influence of Hg Cl₂ on the osphradial multisensory system of *Lymnaea stagnalis* L // Acta Biol. Hung. 1999. Vol. 50. № 1–3. P.

Kiss T., Osipenko O.N. Toxic effects of heavy metals on ionic channels // Pharmacological Reviews. 1994. Vol. 46. № 3. P. 245–267

Romero S.M., Hoffmann A. Role of the cardiac nerve in the adaptive changes of heart rate in response to an aversive stimulus in *Megalobulimus mogianensis* // Brazilian J. Medical and Biological Research, 2008. Vol. 41. P. 432–436

Santini G., Williams G.A., Chellazzi G. Assessment of factors affecting heart rate of the limpets *Patella Vulgata* on the natural shore // Mar. Biol. 2000. Vol. 137. № 2. P. 291–296.

S.-Rozsa K., Salanki J. Heavy metals regulate physiological and behavioural events by modulation ion channels in neuronal membranes of mollusks // Environmental monitoring and assessment. 1990. Vol. 14. P. 363–375.

Styrishave B., Rasmussen A.D., Depledge M.H. The influence of bulk and trace metals on the circadian rhythm of rates in freshwater crayfish *Astacus astacus* // Marine pollution Bull. 1995. Vol. 31 (1–3). P. 87–92.

Szucs A., Salanki J., S-Rozsa K. Effects of chronic exposure to cadmium – or lead-enriched environments on ionic currents of identified neurons in *Lymnaea stagnalis* L. // Cellular and Molecular Neurobiology/ 1994. Vol. 14. № 6. P. 769–780.

Talbot V., Magee R.G. Naturally occurring heavy metalbinding protein in invertebrate // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1978. Vol. 7. P. 149–168.

Winlow W., Syed N. I. The respiratory central pattern generator of *Lymnaea* // Acta Biol. Hung. 1992. Vol. 43. № 1–4. P. 399–408.

CHANGES OF HEART REACTIONS UNDER INFLUENCES OF HEAVY METAL IONS ON MOLLUSKS

N.N. Kamardin, E.L. Kornienko, G.P. Udalova, S.V. Kholodkevich

Scientific Research Center for Ecological Safety RAS, Sankt-Petersburg, Russia
e-mail: nik-kamardin@yandex.ru

By means of electronic microscopy technique it is showed resemblance of osphradium structures at four species of freshwater and marine gastropods (Viviparidae, Lymneidae and Littorinidae). The osphradium receptors are the primary target reacting on chemical substances, in particular heavy metals ions. It is showed alterations of electrophysiological reactions of osphradium neurons under influence of heavy metal ions (Cu, Cd). The neurons of osphradium connect with CNS ganglions, which in turn innervate mollusks heart. The essential part of our study was research of

functional connects of mollusk heart with osphradium receptors, reacted on chemical substances. It is described changes heart reactions under influences of heavy metal ions on intact mollusks *Littorina littorea* and after osphradium extirpation. Received results can be essential for understanding of neuronal mechanisms and ways by means of heavy metal ions influence on heart activity. It is importance also because in present time HR is used as demonstrative physiological biomarker for study of functional state of water invertebrates and for water quality estimation.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ КАЛЬЦИЙАКТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕИНАЗ У БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н. П. Канцерова, Л. А. Лысенко, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук

Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,

e-mail: nkantserova@yandex.ru

Кальпаины (КФ 3.4.22.17; клан СА, семейство С2) – кальций-зависимые протеиназы, ответственные за селективную деградацию белков в цитозоле клеток всех организмов – от прокариот до млекопитающих.

Исследование кальпаинов началось в 1976 году, когда из цитозоля мозга крысы был выделен первый белок этого семейства (Dayton et al., 1976), позднее названный *m*-кальпаином. Вскоре было показано присутствие в тканях его гомолога – *μ*-кальпаина (степень гомологии аминокислотной последовательности свыше 90%) (Suzuki, 1990). Термины *μ*-кальпаин и *m*-кальпаин впервые применили в 1989 году (Cong et al., 1989) для указания на микромолярную (*μ*-кальпаин) и миллимолярную (*m*-кальпаин) концентрации Ca^{2+} , необходимые для активации этих протеиназ *in vitro*. К настоящему времени известны их доменная организация, нуклеотидные последовательности кодирующих их генов, структура активного центра, механизм связывания с Ca^{2+} с последующим конформационным переходом полноразмерной молекулы (механизм активации). С учетом структурных особенностей *μ*- и *m*-кальпаины называют «классическими», а в силу широкой тканевой локализации – «повсеместными». Также охарактеризован кальпастатин, третий важнейший белок-регулятор кальпаиновой системы. Этот ингибитор специфично угнетает протеолитическую активность *μ*- и *m*-кальпаинов, но не влияет на активность других известных протеиназ.

В нативной форме *μ*- и *m*-кальпаины позвоночных имеют гетеродимерную структуру. Их каталитические субъединицы 80 кДа – продукты разных генов (у человека *CAPN1* и *CAPN2*), тогда как регуляторная субъединица 28 кДа (*CPNS1*) едина для обеих форм (Aoki et al., 1986;

Imajoh et al., 1988). Каталитическая 80 кДа субъединица *m*-кальпаина, или кальпаин 2 – типичный полипептид семейства С2 (Rawlings et al., 2010), который подразделяют на основании аминокислотной последовательности на четыре домена (Suzuki, 1990) (рис. 1). По данным кристаллографического анализа, домен II состоит из двух субдоменов, а между доменами III и IV обнаруживается линкерная область (Hosfield et al., 1999; Strobl et al., 2000).

Последовательность *N*-концевого домена I, или пропептида, не имеет гомологов среди известных полипептидов. Каталитический домен II содержит аминокислотный остаток (а.о.) Cys в положении 105 (субдомен IIa), который наряду с а.о. His262 и Asn286 (субдомен IIb), формирует типичную каталитическую триаду цистеиновых протеиназ. Последовательность домена III не имеет гомологов среди известных полипептидов, а функционально классифицируется как С2-подобный (Sorimachi et al., 1997; Nata et al., 2001). Домен III обеспечивает сопряжение каталитического домена II и Ca^{2+} -связывающего домена IV и усиление Ca^{2+} -индуцированных конформационных изменений, а также ассоциацию кальпаинов с фосфолипидами мембран (Tompa et al., 2001). В его последовательности можно выделить два потенциальных Ca^{2+} -связывающих EF-hand-фрагмента, однако, у млекопитающих они функционально неактивны в отличие от кальпаина плоского червя *Schistosoma mansoni* (Andresen et al., 1991). Последовательность домена IV сходна с кальмодулином и содержит пять предполагаемых Ca^{2+} -связывающих EF-hand-мотивов (Strobl et al., 2000; Goll et al., 2003).

У млекопитающих помимо «повсеместных» кальпаинов также обнаружены тканеспецифич-

ные, мРНК которых обнаруживается, главным образом, в клетках скелетных (кальпаин 3а, или р94) (Sorimachi et al., 1989) или гладких мышц (кальпаин 8а, кальпаин 8b) (Sorimachi et al., 1993), в плаценте (кальпаин 6) (Dear et al., 1997), в пищеварительном тракте (кальпаин 9) (Suzuki et al., 2004), в яичках (кальпаин 11) (Dear and Boehm, 1999) или волосяных фолликулах и коже в течение первых 16 дней после рождения (кальпаин 12) (Suzuki et al., 2004). Более широкая тканевая экспрессия характерна для кальпаина 5 (Matena et al., 1998), кальпаина 7 (Futai et al., 2001), кальпаина 10 (Horikawa et al., 2000), кальпаина 13 (Dear and Boehm, 2001) и кальпаина 15 (Suzuki et al., 2004).

На основании сходства доменной организации с 80 кДа субъединицей m-кальпаина и по наличию EF-hand-мотивов в C-концевом домене выделяется группа типичных кальпаинов, другие относятся к атипичным. Замещающие кальмодулинподобный домен вспомогательные домены T, SOH и PWH позволяют разделить атипичные кальпаины на группы гомологов TRA-3, SOL и PalB, соответственно (Бондарева, Немова, 2008).

К настоящему времени известно, что кальпаины присутствуют у большинства организмов от бактерий до человека, исключая архебактерии и вирусы. Анализ полностью или частично расшифрованных геномов организмов (Croall, Ersfeld, 2007) показал, что лишь у немногих отсутствуют гены кальпаинов; у бактерий, большинства простейших, грибов и растений обнаруживается единственный ген кальпаина, тогда как у всех позвоночных животных, а также у ряда паразитарных кинетопластид и инфузорий, присутствуют множественные гены кальпаинов. Большинство ферментов, кодируемых этими генами, еще не выделены, поэтому об их свойствах известно очень немного (Goll et al., 2003; Бондарева и др., 2006; Бондарева, Немова, 2008).

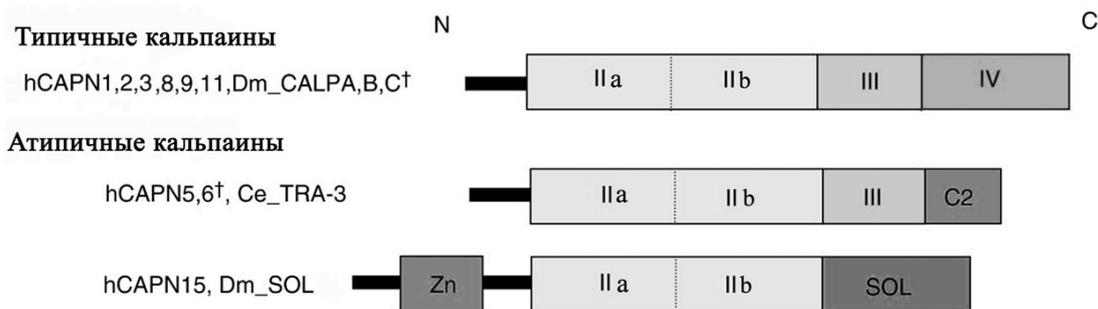
К настоящему моменту кальпаин-кальпастиновая система млекопитающих достаточно хорошо изучена, хотя и в этой области остается ряд нерешенных проблем; так, например, не до конца остается выясненным вопрос о механизмах регуляции активности кальпаинов в живых клетках (Goll et al., 2003; Бондарева и др., 2006). Сведения о кальций-зависимых протеиназах у беспозвоночных ограничиваются, главным образом, идентификацией кодирующих их нуклеотидных последовательностей.

Скрининг библиотеки кДНК плоского червя *Schistosoma mansoni* показал, что в геноме этого

паразитического организма кодируется 768-членный полипептид (86,9 кДа), обладающий сходством с μ -кальпаином человека (сходных а.о. 62%, идентичных а.о. 42%). В структуре этого белка выделяют четыре домена и EF-hand-мотивы, характерные для μ - и m-кальпаинов (Andresen et al., 1991); он однозначно идентифицирован как член семейства кальпаинов, хотя содержит в домене IV только три EF-hand-мотива.

Скрининг библиотеки кДНК дрозофилы *Drosophila melanogaster* выявил четыре последовательности, гомологичные кальпаинам (Delany et al., 1991; Emori and Saigo, 1994; Theopold et al., 1995; Jékely and Friedrich, 1999). Полипептиды CALPA и CALPB содержат четыре типичных для 80 кДа субъединицы m-кальпаина домена, включая четыре EF-hand-мотива в домене IV и на границе доменов II и III, и, следовательно, относятся к типичным кальпаинам. Каталитические а.о. в белке CALPC замещены на а.о. Arg/Ile/Asp, поэтому, вероятно, CALPC не обладает протеолитической активностью. Полипептид SOL (белок малых оптических бугров, или small optic lobes) вместо кальмодулинподобного домена содержит C-концевой домен SOH, а также N-концевой Zn-finger-подобный домен (рис.).

Расшифровка генома нематоды *Caenorhabditis elegans* привела к идентификации 12 генов кальпаин-подобных последовательностей (*C. Elegans* Consortium, 1998), которые можно отнести к четырем группам. Наиболее изучен из них TRA-3, гомологи которого обнаружены у широкого круга организмов, от низших эукариот до млекопитающих. Ген *tra-3 C. elegans* кодирует кальпаин-подобный белок, состоящий из 648 а.о. (73,6 кДа) и обладающий высокой степенью сходства с μ - и m-кальпаинам млекопитающих в области доменов II и III. Однако, вместо кальмодулинподобного домена в белке присутствует T-домен – дополнительный C2-подобный C-концевой домен, представляющий собой Ca^{2+} -связывающий мембранный модуль, который участвует в передаче сигналов и трансмембранном трафике (рис.). Генетический анализ показал, что *tra-3* ген ассоциирован с половой детерминацией *C. elegans*. В эксперименте с трансгенными нематодами, характеризующимися сверхэкспрессией TRA-3, продемонстрирована способность этого белка к селективному Ca^{2+} -зависимому расщеплению белка мембраны TRA-2A, который связывает FEM-3 и тормозит его промоторную функцию в развитии *C. elegans* по мужскому типу (Sokol, Kuwabara, 2000; Sorimachi, Suzuki, 2001).



Модульная организация некоторых белков семейства кальпаинов (адаптировано из: Croall, Ersfeld, 2007)

Показана доменная структура кальпаинов *Drosophila melanogaster* (Dm) и *Caenorhabditis elegans* (Ce) и их гомологи среди кальпаинов человека (hCAPN). † – белки, в которых отсутствуют ключевые а.о. каталитической триады и, как следствие, лишены протеолитической активности. Обозначения доменов: C2 – дополнительный C2-подобный домен; SOL – домен малых оптических бугров (small optic lobe); Zn – Zn-finger домен.

У омара *Homarus americanus* была идентифицирована последовательность кДНК, кодирующая кальпаин-подобный белок, Ha-CalpM (Yu and Mykles, 2003), состоящий из 575 а.о. (предполагаемая молекулярная масса 66,3 кДа). Последовательность кодируемого белка имеет высокую степень сходства с другими кальпаинами в области доменов II и III, но его N-концевой домен I высоко дивергентен (Yu and Mykles, 2003). Поскольку последовательность кальпаина Ha-CalpM не содержит Ca^{2+} -связывающий домен IV, его можно классифицировать как атипичный. Протеиназа Ha-CalpM была частично очищена (Yu and Mykles, 2003), и по ряду свойств (молекулярные массы изоформ, условия их соэлюции при гель-фильтрации и с анионообменника) установлена ее идентичность с ранее описанной CDP III (от англ. calcium-dependent proteases) омара (Mykles and Skinner, 1986). Высокий уровень экспрессии Ha-CalpM в мышцах и способность Ha-CalpM/CDP III к деградации миофибриллярных белков указывают на возможную роль этой протеиназы в функционировании мышечной ткани (Yu and Mykles, 2003). Так, установлено, что Ha-CalpM участвует в процессе дифференцировки мышц клешни омара по быстрому или медленному типу (Medler et al., 2007).

Данные о кальпаин-подобных белках, их структуре и свойствах получены лишь для трематоды *S. mansoni* (Andresen et al., 1991; Siddiqui et al., 1993), плодовой мушки *D. melanogaster*

(Pintèr et al., 1992), а также для ряда видов десятиногих ракообразных (Канцерова и др., 2010) и двусторчатых и головоногих моллюсков (Hatzizisis et al., 2000; Бондарева, 2002; Yu and Mykles, 2003; Kim et al., 2005).

Показана высокая вариабельность структурной организации кальпаинов, выделенных из тканей разных видов беспозвоночных. Значительно различаются молекулярные массы субъединиц и образуемых ими полноразмерных ферментов. Нативные молекулярные массы варьируют от 59 кДа CDP III мускула омара (Mykles and Skinner, 1986) до 520 кДа CDP мускула осьминога (Hatzizisis et al., 1996). Так, у абсолютного большинства беспозвоночных (за исключением трематоды *S. mansoni*) отсутствует малая субъединица, подобная 28 кДа субъединице; кальпаины этих организмов могут существовать в виде мономеров или гомодимеров, но не гетеродимеров. Известно, что CDP IIa и CDP IIb мышцы омара – гомодимеры из субъединиц 60 и 95 кДа, соответственно (Mykles and Skinner, 1986); CDP гребешка и креветки – также гомодимеры (Mykles, 1998). Кальпаин-подобная протеиназа дрозофилы (280 кДа) состоит из нескольких субъединиц с молекулярной массой 94 кДа (Pinter and Friedrich, 1988; Pinter et al., 1992), а CDP мышцы осьминога (520 кДа), вероятно, содержит 8 субъединиц с молекулярной массой 65 кДа (Hatzizisis et al., 1996). Установлено, что кальпаин-подобная протеиназа трематоды *S. mansoni*, аналогично гетеродимерным кальпаинам позвоночных, состоит из двух субъединиц 78 и 28 кДа, при этом 28 кДа полипептид в очищенном препарате присутствует в избытке по отношению к полипептиду 78 кДа (Siddiqui et al., 1993). Двумерный электрофорез показал присутствие двух различных 78 кДа полипептидов и одного 28 кДа полипептида, что позволяет предположить наличие у *S. mansoni* двух гетеродимерных кальпаинов, подобных μ - и m -кальпаинам позвоночных (Siddiqui et al., 1993).

В тканях беспозвоночных до сих пор не обнаружена активность кальпастина; у организмов, геном которых полностью расшифрован, например, *D. melanogaster*, также не идентифицированы гены, кодирующие кальпастин или его гомологи (Laval and Pascal, 2002).

Физиологические субстраты, расщепляемые кальпаин-подобными протеиназами в тканях беспозвоночных, можно разделить на две группы: белки, ответственные за передачу сигналов, и белки цитоскелета. К первой группе белков относят родопсин, протеинкиназу А и протеинкиназу С. Миофибрилярные белки (актин, миозин, парамиозин, тропомиозин, тропонины Т и I) и белки нейрофиламентов принадлежат ко второй группе (Mykles, 1998).

Особенность субстратной специфичности кальпаинов низших животных, по-видимому, заключается в низкой селективности их действия по сравнению с гомологами из теплокровных. Они обладают не только более широкой субстратной специфичностью (Mykles, 1998, Мухин и др., 2000), но и осуществляют более полный гидролиз белков-субстратов до составляющих их коротких пептидов (по данным Mykles (Mykles, 1998), в мышцах ракообразных до 60% белков гидролизуются в цитозоле). Так, например, кальций-зависимые протеиназы из скелетной мышцы клешни омара *Homarus americanus* расщепляют миофибрилярные белки, включая актин и миозин (Mykles, 1998), кальпаин-подобная протеиназа осьминога *Octopus vulgaris* деградирует большинство белков интактных миофибрилл, в частности, миозин, парамиозин, актин (Hatzizisis et al., 2000). Вместе с тем, классические μ - и m -кальпаины млекопитающих не расщепляют ак-

тин, очень медленно гидролизуют миозин, а прочие миофибрилярные белки расщепляют по нескольким связям с образованием крупных фрагментов (Goll et al., 2003).

Для активации кальпаин-подобных протеиназ беспозвоночных требуются миллимолярные концентрации Ca^{2+} (Mykles, 1998; Бондарева и др., 2006; Канцерова и др., 2010), в то время как потребность в кальции у большинства из известных кальпаинов позвоночных животных лежит в микромолярном диапазоне (исключение – m -кальпаин). Для кальций-зависимых протеиназ беспозвоночных животных, как и для кальпаинов позвоночных животных, характерна способность к автолизу, однако его роль недостаточно ясна – у автолизированных кальпаинов беспозвоночных чувствительность к Ca^{2+} не изменяется (Beyette and Mykles, 1997).

Таким образом, наличие у беспозвоночных животных внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеолитических ферментов, сходных по свойствам с кальпаинами млекопитающих, свидетельствует об определенной эволюционной консервативности данного метаболического пути в белковом обмене. Однако, следует отметить, что кальпаинам беспозвоночных животных свойственны эволюционные особенности структурной организации, регуляции активности и выполняемых ими функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-01140-а, 09-04-90733-моб_ст), Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

- Бондарева Л.А., Немова Н. Н., 2008. Молекулярная эволюция внутриклеточных Ca^{2+} -зависимых протеиназ // Биоорганическая химия. Т. 34. № 3. С. 295–302.
- Бондарева Л. А., 2002. Ca^{2+} -активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. Т. 4. № 1. С. 52–57.
- Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., 2006. Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. М.: Наука. 294 с.
- Канцерова Н. П., Ушакова Н. В., Лысенко Л. А., Немова Н. Н. 2010. Кальций-зависимые протеиназы некоторых беспозвоночных и рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 46. № 6. С. 489–494.
- Мухин В. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., Крупнова М. Ю., Оганесян С. А., 2000. Кальций-активируемая протеиназа в половых гаметах морского зеленого ежа (*Strongylocentrotus droebachiensis*) // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 36. С. 3–6.
- Andresen K., Tom T.D.T., and Strand M., 1991. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. J. Biol. Chem. 266: 15085–15090.
- Aoki K., Imajoh S., Ohno S., Emori Y., Koike M., Kosaki G., and Suzuki K., 1986. Complete amino acid sequence of the large subunit of the low- Ca^{2+} -requiring form of human Ca^{2+} -activated neutral protease (μ -CANP) deduced from its cDNA sequence. FEBS Lett. 205: 313–317.
- Beyette J.R., Mykles D.L., 1997. Autolysis and biochemical properties of a lobster muscle calpain-like proteinase. J. Exp. Zool. 227. 106–119.
- C. *Elegans* Consortium. Genome sequence of the nematode, *C. elegans*: a platform for investigating biology., 1998. Science 282: 2012–2046.

- Cong J.Y., Goll D.E., Peterson A.M., and Kapprell H.P., 1989. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* 264(17): 10096–10103.
- Croall D.E., Ersfeld K., 1997. The calpains: modular designs and functional diversity // *Gen. Biol.* 2007. V. 8. P. 218.
- Dayton W.R., Goll D.E., Zeece M.G., Robson R.M., and Reville W.J., 1976. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15: 2150–2158.
- Dear T.N. and Boehm T., 1999. Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes *Capn5*, *Capn6*, and *Capn 11* during development. *Mech. Dev.* 89: 201–209.
- Dear T.N. and Boehm T., 2001. Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274: 245–252.
- Dear T.N., Matena K., Vingron M., and Boehm T., 1997. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175–184.
- Delany S.J., Hayward D.C., Barleben F., Fischbach K.-F., and Miklos G.L.G., 1991. Molecular cloning and analysis of SC optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7214–7218.
- Emori Y. and Saigo K., 1994. Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 269: 25137–25142.
- Futai E., Kubo T., Sorimachi H., Suzuki K., and Maeda T., 2001. Molecular cloning of PalB, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim. Biophys. Acta.* 1517: 316–319.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., and Cong J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83(3): 731–801.
- Hata S., Nishi K., Kawamoto T., Lee H.-J., Kawahara H., Maeda T., Shintani Y., Sorimachi H., and Suzuki K., 2001. Both the conserved and the unique gene structure of stomach-specific calpains reveal processes of calpain gene evolution. *J. Mol. Evol.* 53: 191–203.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., and Beis I., 1996. Purification and properties of a calpain II-like proteinases from *Octopus vulgaris* arm muscle. *J. Comp. Physiol. B.* 113: 295–303.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., and Beis I., 2000. Degradation of myofibrillar proteins by a calpain-like proteinase in the arm muscle of *Octopus vulgaris*. *J. Comp. Physiol. B* 170(5–6): 447–456.
- Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orholm-Melander M., Hara M., Hinori Y., Linder T.H., Mashima H., Schwarz P.E.H., Del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K.S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L.J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C.L., and Bell G.I., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 26: 163–175.
- Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L., and Jia Z., 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18: 6880–6889.
- Imajoh S., Aoki K., Ohno S., Emori Y., Kawasaki H., Sugihara H., and Suzuki K., 1988. Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease. *Biochemistry* 27: 8122–8128.
- Jékely G. and Friedrich P., 1999. Characterization of two recombinant *Drosophila* calpains, CALPA and a novel homolog, CALPB. *J. Biol. Chem.* 274(34): 23893–23900.
- Kim H.W., Chang E.S., and Mykles D.L., 2005. Three calpains and ecdysone receptor in the land crab *Gecarcinus lateralis*: sequences, expression and effects of elevated ecdysteroid induced by eyestalk ablation. *J. Exp. Biol.* 208(Pt 16): 3177–3197.
- Laval M. and Pascal M., 2002. A calpain-like activity insensitive to calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1570: 121–128.
- Matena K., Boehm T., and Dear T.N., 1998. Genomic organization of mouse *CAPN5* and *CAPN6* genes confirms that they are a distinct calpain family. *Genomics* 48: 117–120.
- Medler S., Chang E., Mykles D., 2007. Muscle-specific calpain is localized in regions near motor endplates in differentiating lobster claw muscles. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 148: 591–598
- Mykles D.L. and Skinner D.M., 1986. Four Ca²⁺-dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge, and sensitivity to Ca²⁺ and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261(21): 9865–9871.
- Mykles D.L., 1998. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *Int. Rev. Cytol.* 184: 157–289.
- Pintér M., Stierandova A., and Friedrich P., 1992. Purification and characterization of a Ca²⁺-activated thiol protease from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* 31: 8201–8206.
- Rawlings N.D., Barrett A.J., and Bateman A., 2010. MEROPS: the peptidase database// *Nucleic Acids Res.* V. 38. P. D227-D233
- Siddiqui A.A., Zhou Y., Podesta R.B., Karcz S.B., Tognon C.E., Strejan G.H., Dekaban G.A., and Clarke M.W., 1993. Characterization of Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1181: 37–44.
- Sokol SB and Kuwabara PE., 2000. Proteolysis in *Caenorhabditis elegans* sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3. *Genes Dev* 14: 901–906.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y., and Suzuki K., 1989. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific

expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106–20111.

Sorimachi H., Ishiura S., and Suzuki K., 1993. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* 268: 19476–19482.

Sorimachi H., Ishiura S., and Suzuki K., 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328: 721–732.

Sorimachi H and Suzuki K., 2001. The structure of calpain. *J Biochem* 129: 653–664.

Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., and Bode W., 2000. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 588–592.

Suzuki K., 1990. The structure of the calpains and the calpain gene. In: *Intracellular Calcium-Dependent*

Proteolysis, edited by Mellgren R.L. and Murachi T. Boca Raton, FL: CRC, p. 25–35.

Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., and Sorimachi H., 2004. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 53 (Suppl 1): S12–S18.

Theopold U., Pintér M., Daffre S., Tryselius Y., Friedrich P., Naessel D.R., and Hultmark D., 1995. Calp A, a *Drosophila* calpain homology specifically expressed in a SC set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 824–834.

Tompa P., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K., and Friedrich P., 2001. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1333–1339.

Yu X. and Mykles D.L., 2003. Cloning of a muscle-specific calpain from the American lobster *Homarus americanus*: expression associated with muscle atrophy and restoration during moulting. *J. Exp. Biol.* 206(Pt 3): 561–575.

STRUCTURE AND PROPERTIES PECULIARITIES OF INTRACELLULAR CALCIUM-ACTIVATED PROTEASES IN INVERTEBRATE ANIMALS

N.P. Kantserova, L.A. Lysenko, N.N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: nkantserova@yandex.ru*

The presence of intracellular calcium-dependent proteases (calpains) in invertebrates similar with mammalian calpains suggests that this metabolic pathway in protein turnover is conservative. Some

evolutionary-related peculiarities observed in invertebrate calpains concern their structural organization, substrate specificity, activity regulation and biological roles.

ОЦЕНКА РЫБАМИ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ С ПОМОЩЬЮ ВНУТРИРОТОВОЙ РЕЦЕПЦИИ: ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

А. О. Касумян

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия,
e-mail: alex_kasumyan@mail.ru*

Пищевое поведение рыб представляет собой сложный процесс, состоящий из многих этапов и фаз, последовательно переходящих одна в другую. Начинается пищевое поведение с момента, когда животное достигает определенного уровня пищевой мотивации и запускается пищевой поиск, вначале ненаправленный, а затем ориентированный к источнику пищевого сигнала. Завершается пищевое поведение обнаружением объекта, оценкой его соответствия пищевым потребностям рыбы, потреблением или отверганием (Павлов, Касумян, 1998). Пищевое поведение крайне разнообразно по проявлению и зависит от образа жизни рыб, систематики, возраста, физиологического состояния и т.п. Многие рыбы значительную часть своего суточного бюджета времени затрачивают именно на эту форму поведения. С сенсорной точки зрения пищевое поведение интересно тем, что в его регуляции у рыб принимают участие все без исключения органы чувств (Павлов, Касумян, 1990). В большинстве исследований, касающихся пищевого поведения, основное внимание уделяется этапам поиска, обнаружения, распознавания и выбора жертв. Значительно меньше известно о закономерностях и механизмах, касающихся последней фазы пищевого поведения – консуматорной, которая включает предварительную и окончательную оценку пищевой пригодности добычи, а в некоторых случаях – подготовку объекта к заглатыванию. Заканчивается фаза потреблением или отверганием схваченной добычи.

Тестирование рыбами схваченной добычи происходит за счет внутриротовых рецепторов, прежде всего вкусовых и тактильных. На основе этой информации рыбами принимается решение о заглатывании или об отказе от по-

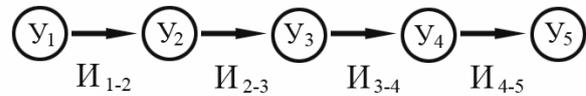
ребления схваченного объекта. В последние годы получен большой экспериментальный материал, который дает представление об основных функциональных свойствах внутриротовой вкусовой рецепции рыб. Выяснено, что эта сенсорная система позволяет рыбам распознавать присутствие в пищевых объектах различных веществ. Определен уровень вкусовой чувствительности рыб, выяснено, что многие из химических веществ и их смесей обладают разной вкусовой привлекательностью и могут вызывать позитивные и негативные вкусовые ответы. Установлено также, что вкусовые предпочтения рыб характеризуются высокой видовой специфичностью, низкими популяционными и половыми отличиями, проявляют устойчивость к ряду внешних факторов биотической и абиотической природы (Касумян, 1997; Kasumyan, Døving, 2003).

Тактильная рецепция, в том числе ее внутриротовая компонента, у рыб изучена очень слабо. Существующие сведения крайне малочисленны, данные о структуре механочувствительных рецепторных образований рыб фактически отсутствуют, представления о функциональных параметрах тактильной рецепции и соматовисцеральной системы в целом фактически не сформированы даже в общем виде. Вместе с тем, разнообразные косвенные наблюдения и другие данные позволяют считать, что внутриротовая тактильная рецепция выполняет важную роль в жизни рыб, в обеспечении процесса выбора, внутриротовой обработки и потребления кормовых объектов. Поведение рыб на этих завершающих этапах питания может в значительной мере определяться и контролироваться на основе информации, поступающей от ротовых тактильных рецепторов в мозговые интегративные центры.

Поведение рыб, связанное с завершающей сенсорной оценкой (тестированием) пищевых объектов, с определением рыбами их вкусовых и текстурных свойств, ранее не являлось предметом специальных исследований. Упоминания об особенностях такой оценки встречаются лишь эпизодически в работах по питанию и пищевому поведению рыб. Целенаправленный поиск и систематизация таких данных, полученных другими авторами и анализ результатов собственных многолетних исследований, позволяет сформулировать некоторые общие положения, касающиеся пищевого тестирования и сенсорного обеспечения этого поведения.

Установлено, что заглатывание добычи или окончательный отказ от ее потребления у рыб большинства исследованных видов редко происходит после однократного внутриротового тестирования. Чаще всего пищевой объект многократно отвергается и схватывается повторно. Таким образом, структура поведения внутриротового тестирования довольно простая и состоит из последовательности элементарных циклов «схватывание-удержание-отвергание», разделяемых интервалами, предшествующими очередному схватыванию (рис. 1). Предназначение таких манипуляций с пищевым объектом может быть разным. У некоторых рыб, таких как щука *Esox lucius* и других, такие действия необходимы для перехватывания жертвы и ориентации ее определенным образом перед заглатыванием (Pavlov, Kasumyan, 2002). Это характерно не только для рыб-ихтиофагов, но и для питающихся зоопланктоном. Отмечается, что трехиглые колюшки *Gasterosteus aculeatus* при питании крупными планктонными объектами часто отвергают и повторно схватывают крупную добычу, с мелкими организмами они поступают более решительно (Hart, Gill, 1994). Такое поведение – отвергание схваченной пищи, обычно для повторного схватывания, многие авторы называют spitting behaviour. У трехиглой колюшки spitting behaviour зависит не только от размера жертвы, но и от социального фактора: если в непосредственной близости от питающейся особи находится другая рыба, то в такой ситуации колюшка после схватывания объекта отвергает добычу намного реже и пытается проглотить ее с первого раза. Ротан *Percottus glehnii* чаще демонстрирует spitting behaviour, когда хватает головастика серой жабы *Bufo*

bufo, в коже которых, как полагают, содержатся защитные вещества, и гораздо реже, если хватает головастика лягушек *Rana* (Мантейфель, Решетников, 2001).



Структура поведения внутриротового тестирования рыбами свойств пищевого объекта: Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 и Y_5 – удержание объекта после 1-го, 2-го и последующих схватываний; $I_{1-2}, I_{2-3}, I_{3-4}$ и I_{4-5} – интервалы между 1-м и 2-м, 2-м и 3-м и последующими схватываниями

Несмотря на то, что spitting behaviour характерно для многих рыб, особенности этого поведения и причины его вызывающие не исследованы. Не ясно как оно организовано, чем и насколько сильно различается у разных рыб, от чего зависит, как формируется и т.п. Некоторые из этих вопросов решались нами попутно при проведении работ по изучению вкусовых предпочтений рыб, для выяснения других вопросов требовалось проведение специальных экспериментов.

Обнаружено, что число элементарных циклов поведения внутриротового тестирования пищевого объекта («схватывание-удержание-отвергание»), совершаемых рыбами при питании, широко варьирует. Среди исследованных видов рыб наибольшее число повторных схватываний зафиксировано нами в опытах на леще *Abramis brama* – до 15–16, а в отдельных опытах до 20 (Исаева, 2007). Учитывая, что время, затрачиваемое рыбами на поведение тестирования, в целом редко превышает 1–2 мин, такие элементарные циклы продолжаются обычно несколько секунд, а иногда – лишь сотни миллисекунд или даже меньше. Разные виды рыб в разной мере склонны отвергать и вновь схватывать один и тот же пищевой объект для повторного тестирования. Речные рыбы, живущие на потоке (кумжа *Salmo trutta*, голянь *Phoxinus phoxinus* и др.), рыбы со слабым зрением или малоподвижные (мешкожаберный сом *Heteropneustes fossilis*, полярная камбала *Liopsetta glacialis* и др.) совершают повторные схватывания редко. Биологический, адаптивный смысл такого поведения вполне понятен – ведь отказ от уже схваченного объекта может закончиться его потерей из-за сноса потоком, а у рыб с недостаточно хорошо развитым зрением – потерей из-за трудностей повторного обнаружения объекта. Рыбы, живу-

щие преимущественно в стоячей воде (линь *Tinca tinca*, карп *Cyprinus carpio*; трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus*, девятииглая колюшка *Pungitius pungitius*) совершают большее число повторных схватываний (Касумян, Морси, 1996; Kasumyan, Nikolaeva, 2002; Прокопова, 2007; Михайлова, 2009). Полученные в последнее время данные показывают, что этот показатель – частота манипуляций с пищевым объектом, может модифицироваться индивидуальным опытом особи и отличаться у рыб-конспецификов речных и озерных популяций (Михайлова, 2009).

Число повторных тестирований объекта зависит от вкусовой привлекательности объекта. Этот вывод сделан на основании данных экспериментов с искусственными агар-агаровыми гранулами, отличающимися только содержащимся в них веществом, но унифицированных по размеру, форме и цвету. Обнаружено, что связь между числом повторных схватываний и вкусовой привлекательностью таких гранул разнообразна по своему проявлению и может быть положительной и отрицательной, линейной или более сложной. Наиболее распространенный случай – это куполообразная кривая, когда рыбы наиболее часто повторно тестируют объекты с невыраженными или со слабо выраженными вкусовыми свойствами, а объекты с высоко привлекательным или резко неприятным вкусом заглатывают или окончательно отвергают уже после 1–2 тестирующих схватываний и удержаний (Касумян, Сидоров, 1992, 2005; Касумян, Прокопова, 2001; Kasumyan, Nikolaeva, 2002).

Влияние на повторные схватывания текстурных (тактильных) свойств объекта остается невыясненным. Первые эксперименты показывают, что снижение привлекательности объектов, вызванное изменением их твердости, сопровождается уменьшением частоты проявления рыбами spitting behavior. Возможно, что связь между этим параметром поведения тестирования и вкусовыми и текстурными свойствами пищевого объекта носит общий характер.

Исследование временной динамики проявления рыбами поведения тестирования выявило ряд важных особенностей. Было обнаружено, что удержания объекта не равнозначны по длительности: первое удержание всегда наиболее продолжительное, а все последующие значительно короче и их длительность закономерно снижается. По-видимому, первое зна-

комство с объектом и оценка его сенсорных свойств наиболее важная для принятия рыбами решения о соответствии или несоответствии пищевым потребностям особи. Длительности интервалов между схватываниями варьируют, на какая-либо тенденция изменения этого показателя по ходу тестирования не прослеживается. Временной интервал, в течение которого ротовая полость рыб свободна, по-видимому, требуется на восстановление чувствительности располагающихся здесь внутриворотных рецепторов. Известно, что вкусовые почки относятся к быстро адаптирующимся рецепторам и поэтому эффективность вкусовых раздражителей при постоянном воздействии сохраняется относительно короткое время. Такими же свойствами обладают и некоторые механорецепторы. Однако клетки Меркеля, которых находят в эпителии ротовой полости рыб (Lane, Whitear, 1977; Whitear, 1989), относятся к медленно адаптирующимся механорецепторам.

Процесс тестирования пищи, начиная от первого схватывания и кончая последним удержанием, заглатыванием или окончательным отказом от потребления, у рыб редко продолжается более 1–2 минут. Суммарная (общая) длительность вкусового тестирования объекта не является некой одинаковой, стандартной величиной, она достаточно широко варьирует в указанных выше пределах. Суммарное время пребывания объекта в ротовой полости рыб в течение всей процедуры тестирования обычно короче у речных рыб и у рыб с хорошим развитием зрения и гораздо длиннее у питающихся бентосом донных и придонных рыб. Хотя, в этом правиле встречается много исключений. Наибольшее значение, по-видимому, имеет первое тестирование объекта. Длительного первого удержания объекта и суммарная длительность – это два хорошо коррелирующих друг с другом параметра, которые тесно связаны и с вкусовыми свойствами объекта. У некоторых видов связь положительная, т.е. объекты с привлекательным вкусом удерживаются рыбами дольше, чем менее привлекательные. Такая связь проявляется не на всем диапазоне возможных значений вкусовой привлекательности. Например, первое и суммарное удержание объектов с максимальным уровнем вкусовой привлекательности у многих рыб очень короткое, в несколько раз короче, чем объектов с невысокими вкусовыми свойствами.

Этот факт подчеркивает, что на распознавание вкусовых качеств объекта и принятие адекватного решения рыбам требуется тем меньше времени, чем более отчетливым вкусом он обладает.

Суммарная длительность удержания объекта зависит и от числа повторных схватываний – чем их больше, тем больше суммарное время пребывания объекта в ротовой полости рыб. Однако эта положительная зависимость не прямолинейная, а затухающая: с увеличением числа повторных схватываний быстрый рост суммарной длительности удержания объекта замедляется, а затем и вовсе прекращается. Это указывает на существование некоего отрезка времени, за пределы которого рыбы редко выходят при распознавании вкусовых качеств объекта и реализации вкусового ответа. У рыб это время составляет от нескольких секунд до нескольких десятков секунд и редко превышает 1 минуту. Минимальное время, требуемое рыбами на тестирование свойств пищевых объектов и реализацию негативного поведенческого ответа (отказ от потребления), как показали опыты на гольяне *Phoxinus phoxinus*, в среднем составляет от 250 до 400 мс и не зависит от вкусовых качеств объекта. В отдельных случаях негативный ответ реализуется в течение 40–80 мс. Это время суммирует длительность каскада процессов от рецепции сигнала в ротовой полости и проведения информации в первичные вкусовые мозговые центры, до ее анализа, формирования решения и реализации поведенческого акта.

Внутриротовое тестирование любого схваченного рыбами пищевого заканчивается его потреблением или отказом от заглатывания. Соотношение долей потребленных и отвергнутых пищевых объектов одного и того же качества является основным количественным выражением их привлекательности для рыб. Сравнение опытов, завершившихся потреблением рыбами искусственного пищевого объекта (гранулы корма) и опытов, в которых такие же объекты были отвергнуты, показало, что тестирование в этих двух случаях происходит по-разному. Так, усатый голец *Barbatula barbatula* в опытах, закончившихся потреблением объекта, в 3–4 и более раз дольше удерживает гранулу после первого схватывания и суммарно за всё время опыта. Причем эта особенность проявляется для всех типов гранул независимо от вкусовой

привлекательности содержащихся в них веществ. Повторные схватывания происходят примерно в 1,5 раза чаще в опытах, в которых гранулы рыбами поедались, но эти отличия проявляются в опытах не со всеми типами гранул (Касумян, Сидоров, 2010). Такие же по характеру отличия опытами с потреблением и с отверганием корма выявлены у линя *Tinca tinca*, у карпа *Cyprinus carpio* и у других исследованных рыб.

Эти результаты дают основание считать, что тестирование рыбами пищевых объектов осуществляется по двум разным поведенческим стереотипам. Знание этих стереотипов позволяет с определенной степенью уверенности прогнозировать исход тестирования еще в его начале. Длительное первое удержание с большой вероятностью указывает на то, что объект будет потреблен рыбой, даже после вполне возможных, но немногочисленных повторных схватываний. Короткое первое удержание пищевого объекта и большое число промежуточных отказов и повторных схватываний служит признаком, указывающим на то, что в итоге рыба откажется от потребления объекта, с которым она производит манипуляции. Еще одним отличием между опытами с потреблением и с отказом от гранулы, является время, затрачиваемое рыбами на определение свойств гранулы и реализацию принятого решения. В первом случае общее время тестирования (сумма длительности всех фаз реакции от момента подачи гранулы рыбе и до завершения опыта) значительно больше (у карпа в 2 и более раз), несмотря на меньшее число повторяющихся элементарных циклов тестирования «схватывание-удержание-отвергание». Предполагается, что решение о заглатывании или отвергании пищевого объекта формируется у рыб рано, еще во время первого схватывания, т.е. при первой оценке свойств объекта, которое обычно бывает наиболее длительным. Таким образом, первое знакомство рыб с вкусовыми свойствами схваченного объекта является наиболее значимым.

Известно, что оценка пригодности пищи и принятие животными решения о ее потреблении представляет собой результирующую интеграции в мозговых центрах информационных потоков, поступающих по разным сенсорным каналам. Приведенные результаты показывают, что у рыб такое решение основано на сигналах, идущих от расположенных

в ротовой полости вкусовых и тактильных рецепторов. Вполне вероятно, что определенную роль в этом играют и другие типы рецепторов соматосенсорной системы (болевые, температурные), а также относящиеся к другим сенсорным системам. Решение о потреблении пищевого объекта формируется у рыб рано, еще в ходе первого тестирования, а его реализация, требующая относительно короткого времени, протекает по одному из двух возможных стереотипов независимо от того,

какая из внутриротовых сенсорных систем, вкусовая или тактильная, является ведущей в решении рыб проглотить или отказаться от потребления схваченного пищевого объекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 10-04-00349) и Программы «Ведущие научные школы» НШ-3231.2010.4 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (Госконтракт № 02.740.11.0280)

Литература

Исаева О. М. 2007. Вкусовые предпочтения и вкусовое поведение карповых рыб: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Московский государственный университет, 25 с.

Касумян А. О. 1997. Вкусовая рецепция и пищевое поведение рыб // *Вопр. ихтиологии*. Т. 37. № 1. С. 78–93.

Касумян А. О., Морси А. М. Х. 1996. Вкусовая чувствительность карпа, *Cyprinus carpio*, к свободным аминокислотам и классическим вкусовым веществам // *Вопр. ихтиологии*. Т. 36. № 3. С. 386–399.

Касумян А. О., Прокопова О. М. 2001. Вкусовые предпочтения и динамика вкусового поведенческого ответа у линя *Tinca tinca* (Cyprinidae) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 41. № 5. С. 670–685.

Касумян А. О., Сидоров С. С. 1992. Вкусовая чувствительность кеты *Oncorhynchus keta* к основным типам вкусовых раздражителей и аминокислотам // *Сенсорные системы*. Т. 6. № 3. С. 100–103.

Касумян А. О., Сидоров С. С. 2005. Вкусовые предпочтения кумжи *Salmo trutta* трех географически изолированных популяций // *Вопр. ихтиологии*. Т. 45. № 1. С. 111–123.

Касумян А. О., Сидоров С. С. 2010. Вкусовые предпочтения и поведение тестирования вкусовых качеств корма у усатого гольца *Barbatula barbatula* (Balitoridae, Cypriniformes) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 50. № 6.

Мантейфель Ю. Б., Решетников А. Н. 2001. Избирательность потребления хищниками головасти-

ков трех видов бесхвостых амфибий // *Журн. общ. биол.* Т. 62. № 2. С. 150–156.

Михайлова Е. С. 2009. Вкусовые предпочтения и особенности пищевого поведения трёхиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* и девятииглой колюшки *Pungitius pungitius*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 23 с.

Павлов Д. С., Касумян А. О. 1990. Сенсорные основы пищевого поведения рыб // *Вопр. ихтиологии*. Т. 30. Вып. 5. С. 720–732.

Павлов Д. С., Касумян А. О. 1998. Структура пищевого поведения рыб // *Вопр. ихтиологии*. Т. 38. № 1. С. 123–136

Gill A.B., Hart P.J.B. 1994. Feeding behavior and prey choice of the threespine stickleback: the interacting effects of prey size, fish size and stomach fullness // *Anim. Behav.* V. 47 P. 921–932.

Kasumyan A., Døving K.B. 2003. Taste preferences in fish // *Fish and Fisheries*. V. 4. № 4. P. 289–347.

Kasumyan A.O., Nikolaeva E.V. 2002. Comparative analysis of taste preferences in fishes with different ecology and feeding // *J. Ichthyol.* V. 42. Suppl. 2. P. 203–214.

Lane E.B., Whitear M. 1977. On the occurrence of Merkel cells in the epidermis of teleost fishes // *Cell Tissue Res.* V. 182. P. 235–246.

Pavlov D.S., Kasumyan A.O. 2002. Feeding diversity in fishes: trophic classification of fish // *J. Ichthyol.* V. 42. Suppl. 2. P. S137–S159.

Whitear M. 1989. Merkel cells in lower Vertebrates // *Arch. Histol. Cytol.* V. 52. Suppl. P. 415–422.

EVALUATION OF FOOD ITEM QUALITY BY INTRAORAL RECEPTORS IN FISHES: BEHAVIORAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS

A.O. Kasumyan

Moscow State University, Moscow, Russia,
e-mail: alex_kasumyan@mail.ru

Fish evaluate the quality of a food item and make final decision to swallow or to reject it on the base of information obtained through the

gustatory and tactile receptors located in the oral epithelium. Several repeated test events (grasp-retention-rejection) usually are performed

before fish swallow or refuse a food item. Riverine fish and fish with poor vision perform low number of repeated tests instead of fish from lakes and ponds who have inclination to manipulate with food items many times. The number of grasps depend on palatability and most probably on texture of food item also. The

time for final decision takes not more than several seconds or several dozen seconds only. The shortest retention time is around 250–400 ms (minnow *Phoxinus phoxinus*). The strong difference was founded between patterns of fish testing behavior in trials finished by swallowing or by refusing of offered food item.

ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ЧЕРНОМОРСКОГО БЫЧКА-КРУГЛЯКА *NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS* В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД

Т. Б. Ковыршина

Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, Украина
e-mail: mtk.fam@mail.ru

Введение

Для оценки качества водной среды в настоящее время широко применяются методы экологического мониторинга с использованием биохимических маркеров состояния гидробионтов (Руднева, 2010). Ключевыми неспецифическими параметрами, позволяющими определить функциональный статус организма в условиях антропогенного прессинга, признаны активность ферментов антиоксидантной системы (АОС), интенсивность процессов окислительной модификации биомолекул, система монооксигеназ (цитохром P-450, EROD), металлотионеины и др. (Van der Oost et al., 2003). В то же время интерпретация полученных результатов может осложняться наличием естественных метаболических флуктуаций, связанных с репродуктивной активностью биомониторных видов, зараженностью паразитами, сезонными изменениями параметров среды обитания и обеспеченностью пищей в течение года (Скуратовская, 2009). В связи с этим изучение пределов естественной вариабельности биомаркеров в популяциях изучаемых видов является необходимым условием для их корректного применения.

Бычок-кругляк – самый массовый представитель сем. Gobiidae, обитающий в Азово-Черноморском бассейне. Необычайная эврибионтность, характерная для этого вида, позволяет ему жить, размножаться и развиваться в большом диапазоне природных условий (Москалькова, 1996). Последний факт, наряду с малоподвижным образом жизни и придонной локализацией делает кругляка перспективным объектом для биомониторинговых исследований и требует тщательного изучения его биологии, в том числе репродуктивной. Нерест у кругляка сильно растянут, он длится с конца апреля по сен-

тябрь (Москалькова, 1996). Созревание половых продуктов, а также подготовка и охрана гнезда самцом на протяжении длительного времени требует траты значительных пластических и энергетических ресурсов, что отражается на работе систем поддержания гомеостаза, включая антиоксидантную.

На основании этого цель работы состояла в изучении влияния стадии репродуктивного цикла особей на динамику активности АО ферментов крови бычка-кругляка

Материалы и методы

Объектом исследований служил бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* Pallas), соответствующий требованиям, предъявленным к биомониторным видам (Руднева, 2010). Рыбу отлавливали в прибрежных районах Черного моря (г. Севастополь) в период 2001–2003 гг.

Кровь рыб отбирали из хвостовой артерии, гемолизаты получали по методу Троицкой (Троицкая, 1972), в которых определяли активность пяти антиоксидантных (АО) ферментов. Активность каталазы (КАТ) определяли по реакции разложения перекиси водорода (Асатиани, 1969), супероксиддисмутазы (СОД) – спектрофотометрическим методом в системе нитросиний тетразолияевый-феназинметасульфат-никотиамиддинуклеотид (НСТ-ФМС-НАДН) (Nishikimi et al., 1972). Активность пероксидазы (ПЕР) определяли бензидиновым методом (Литвин, 1981), глутатионредуктазы (ГР) – по реакции деградации никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФН), глутатионтрансферазы (ГТ) – по накоплению конъюгата в присутствии 2,4-динитрохлорбензола (Переслегина, 1989). На основании полученных результатов был рассчитан интегральный показатель ферментной антиоксидантной активности (ИП ФАОА),

который представляет арифметическую сумму активностей всех исследованных ферментов.

Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными в случае, если $p \leq 0,05$ (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Как можно видеть из таблицы, у самцов активность КАТ достоверно падает ($p \leq 0,01-0,001$) в ряду покой, преднерестовый \rightarrow нерестовый \rightarrow посленерестовый период.

Активность антиоксидантных ферментов (на мг гемоглобина/мин, $M \pm m$) в крови самок и самцов черноморского бычка-кругляка в зависимости от стадии репродуктивного цикла

Фермент	Период репродуктивного цикла			
	Покой	Преднерестовый	Нерест	Посленерестовый
Самки				
КАТ, мг H_2O_2	0,49 \pm 0,13 n=4	0,66 \pm 0,06 n=21	0,73 \pm 0,45 n=3	–
СОД, усл. ед.	178,2 \pm 63,0 n=4	396,3 \pm 79,0* n=18	155,6 \pm 125,3 n=3	–
ПЕР, опт. ед.	7,7 \pm 1,7 n=4	9,49 \pm 1,28 n=21	18,7 \pm 12,2 n=3	–
ГР, нмоль НАДФН	6,52 \pm 3,81 n=4	8,72 \pm 2,0 n=17	7,84 \pm 7,66 n=3	–
ГТ, нмоль конъюгата	7,97 \pm 0,54 n=2	139,4 \pm 108,9 n=4	17,4 \pm 9,57 n=3	–
Самцы				
КАТ, мг H_2O_2	0,53 \pm 0,03 n=29	0,51 \pm 0,03 ^o n=73	0,41 \pm 0,02* [*] n=25	0,33 \pm 0,04* [*] n=3
СОД, усл. ед.	148,2 \pm 29,7 n=22	164,7 \pm 19,5 ^o n=62	98,3 \pm 21,0* [*] n=20	159,0 \pm 43,0 n=3
ПЕР, опт. ед.	11,4 \pm 1,5 n=29	10,9 \pm 0,98 n=73	13,8 \pm 3,3 n=25	25,1 \pm 9,1 n=3
ГР, нмоль НАДФН	4,83 \pm 1,5 n=4	6,46 \pm 1,08 n=57	2,86 \pm 0,86* [*] n=21	3,33 \pm 0,86* [*] n=3
ГТ, нмоль конъюгата	18,3 \pm 3,7 ^o n=22	23,3 \pm 3,08 n=38	12,1 \pm 1,8* [*] n=19	–

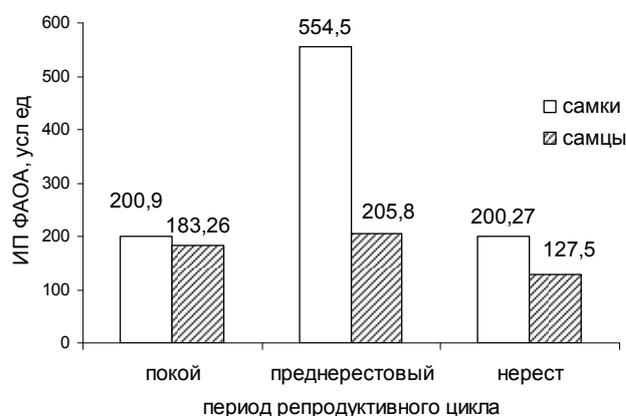
Примечания: * – достоверность различий с периодом покоя ($p \leq 0,05-0,001$); * – с преднерестовым ($p \leq 0,05-0,01$); ■ – с нерестовым ($p \leq 0,05-0,01$); ^o – достоверные межполовые различия

Значения активности СОД и ГТ достоверно снижены ($p \leq 0,01$; $0,05$ соответственно) во время нереста, а ГР ($p \leq 0,05$) и в посленерестовый период по сравнению с показателями этих ферментов на преднерестовой стадии. Достоверных различий для активности ПЕР не обнаружено.

У самок бычка-кругляка наблюдается тенденция увеличения активности АО ферментов у рыб на преднерестовой стадии по сравнению с периодом отдыха, однако различия достоверны только для СОД ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ исследуемых ферментов между самками и самцами кругляка на соответствующей стадии зрелости гонад не показал достоверных различий. Исключением является увеличение активности ГТ ($p \leq 0,05$) в крови самцов на стадии покоя, а у самок – КАТ ($p \leq 0,01$) и СОД ($p \leq 0,01$) в преднерестовый период.

Интегральный показатель ферментной антиоксидантной активности (ИП ФАОА) у самок и самцов в разные периоды репродуктивного цикла представлен на рисунке.



ИП ФАОА у самок и самцов черноморского бычка-кругляка в зависимости от стадии репродуктивного цикла

Полученные значения ИП ФАОА демонстрируют увеличение общей активности ферментов АОС у самок и самцов на преднерестовой стадии по сравнению с периодом покоя и нереста. Кроме того, ИП ФАОА у самцов почти в 3 раза ниже на стадии созревания гонад и в 1,5 раза в период нереста, чем соответствующие показатели у самок бычка-кругляка.

Таким образом, динамика активности АО ферментов у самок и самцов зависит от стадии зрелости гонад, но у самцов это выражено в большей степени, что связано с особенностями нерестового поведения.

В период нереста постройкой и охраной гнезд занимаются только самцы бычка-кругляка. Они аэрируют гнездо, очищают его от заиления и защищают от врагов вплоть до выклева молоди (Световидов, 1964). Для бычка-кругляка характерен порционный нерест и каждый самец привлекает в гнездо несколько самок, оплодотворяя каждую кладку икры (Калинина, 1976). Кругляк нерестится дольше, чем другие виды бычковых – 3–4 месяца и одной самкой в нерестовый период выметывается 5–6 порций икры (Москалькова, 1996). Самцы во время нереста и охраны гнезд не питаются, сильно худеют, и значительная часть их после этого погибает (Световидов, 1964).

Таким образом, изменение образа жизни, повышенная активность самцов требует значительных затрат энергии и, следовательно, соответствующей реорганизации метаболизма. Хронический стресс, связанный с обеспечением охраны гнезда с икринками и его аэрации, истощает защитные механизмы самцов, включая нару-

шение баланса прооксидантно-антиоксидантных процессов, что отразилось в снижении активности АО ферментов.

В наших исследованиях активность СОД в крови самок и практически всех ферментов в крови самцов имели максимальные значения в период созревания гонад, о чем свидетельствуют высокие значения ИП ФАОА. Вероятно, это связано с участием ферментов АОС в метаболизме физиологически активных веществ в этот период (Алешко, Лукьянова, 2008). В то же время активность КАТ, СОД, ГР и ГТ в крови самцов во время нереста, а также КАТ и ГТ в посленерестовый период достоверно снижались по сравнению с преднерестовой стадией. ИП ФАОА при этом более чем в 1,5 раза снижался у самцов в период нереста. Подобная динамика обусловлена сокращением поступления с пищей важных низкомолекулярных АО и микроэлементов, необходимых для синтеза АО ферментов у самцов в нерестовый период. Кроме того, возрастание рекреационной нагрузки на прибрежные акватории в теплый сезон года и увеличение загрязнения воды вызвало окислительный стресс и соответствующие отклики со стороны АО ферментативной системы.

Выявленные нами половые различия активности СОД и КАТ могут быть связаны с более высоким уровнем метаболических превращений в период формирования половых продуктов у самок кругляка, чем у самцов.

Таким образом, результаты исследований показали необходимость изучения диапазона вариаций исследуемых биомаркеров, обусловленных особенностями биологии вида-биомонитора.

Литература

Алешко С. А., Лукьянова О. Н. Сезонные изменения некоторых параметров биотрансформации и антиоксидантной системы в печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива Японского моря // Биология моря. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 148–151.

Асатиани В. С. Ферментные методы анализа. – М.: Наука, 1969. – 611 с.

Калинина Э. М. Размножение и развитие азово-черноморских бычков. – Киев: Наук. думка, 1976. – 120 с.

Лакин Г. Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

Литвин Ф. Ф. Практиком по физико-химическим методам в биологии. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – С. 86–87.

Москалькова К. И. Экологические и морфо-физиологические предпосылки к расширению ареала у

бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* в условиях антропогенного загрязнения водоемов // Вопросы иктиологии. – 1996. – Т. 36, № 5. – С. 615–621.

Переслегина И. А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 20–23.

Руднева И. И. Загрязнение, контроль, анализ и охрана экологических систем // Экологические системы и приборы. – 2010. – № 2. – С. 3–11.

Световидов А. Н. Рыбы Черного моря. – М. – Л.: Наука, 1964. – 552 с.

Скуратовская Е. Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: дис... кандидата биол. наук: 03.00.04. – Одесса, 2009. – 120 с.

Троицкая О. В. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

Nishikimi M., Rao N.A., Jagik K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine // *Biochim. Biophys. Res. Com.* – 1972. – Vol. 46, № 2. – P. 849–854.

Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* – 2003. – Vol. 13, № 2. – P. 57–149.

**ANTIOXIDANT ENZYMES SYSTEM PECULIARITIES IN ROUND-GOBY'S BLOOD
NEOGOBIUS MELANOSTOMUS IN SPAWNING SEASON**

T.B. Kovyreshina

*Institute of the Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Ukraine,
e-mail: mtk.fam@mail.ru*

Influence of stage of gonads on the activities of antioxidant enzymes in blood erythrocytes was determined by example of round-goby *Neogobius melanostomus* collected from coastal zones of the Black Sea (area of Sevastopol). The results

obtained have showed that antioxidant enzymes activities in both sexes depended on period of year, but for males it was more expressed. The detected sex differences can be associated with behaviour spawning this specie.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ МЕДИ И КАДМИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ МИДИЙ *MYTILUS EDULIS* L.

М. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова, В. С. Скидченко

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия

Тяжелые металлы – одни из основных поллютантов, поступающих в морскую среду, главным образом, с атмосферными осадками и в процессе таяния снега. Одними из наиболее удобных объектов для изучения влияния ксенобиотиков, в том числе тяжелых металлов, признаны морские беспозвоночные. В сравнении с позвоночными животными многие виды моллюсков обладают слаборазвитой способностью к биотрансформации ксенобиотиков. Мидии *Mytilus edulis* – один из важнейших представителей марикультуры Белого моря, которые являются в то же время удобным объектом для исследований, так как ведут неподвижный образ жизни и являются, как известно, биофильтрами моря. Успехи, достигнутые в исследованиях протеиназ (Мосолов, 1988; Немова, 1996, Немова, 2005), практически не коснулись морских беспозвоночных. Вместе с тем, моллюски, ракообразные и иглокожие относятся к наиболее древним, многочисленным в видовом отношении и разнообразным по экологии классам животных. Системное исследование протеолитических ферментов у этих беспозвоночных позволит изучить их функциональную роль в жизнедеятельности, даст возможность оценить процесс протеолиза под влиянием различных биотических и абиотических воздействий. Известно, что реализация защитной функции лизосом при воздействии на организм внутренних и внешних факторов осуществляется при участии лизосомальных гидролаз, в том числе протеолитических (катепсинов) (Дин, 1981). Стабильность лизосомальных мембран, как и активность ферментного комплекса, может в значительных пределах меняться при различных патологических состояниях организма. Например, при гипоксии, изменении кислотно-щелочного равновесия, воздействии тяжелых металлов и др. (Немова, Сидоров, 1980; Немова, 1996; Moore, 1985; Nemova et al., 2004).

В настоящей работе изучали изменение активности основных лизосомальных протеиназ животных тканей – катепсинов В (тиолзависимой приетиказы) и D (карбоксилзависимой протеиназы) в жабрах и гепатопанкреасе мидий *Mytilus edulis* L. при воздействии солей меди и кадмия в эксперименте *in vitro*. В условиях аквариального эксперимента моллюски подвергались воздействию кадмия, неэссенциального металла, способного связываться с SH-группами биомолекул, и меди – эссенциального металла, в высоких концентрациях токсичного для организма.

Аквариальный эксперимент был выполнен на одноразмерных мидиях, отловленных на сублиторали в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря. После акклимации к лабораторным условиям мидии были разделены на 7 групп и помещены в аквариумы, содержащие растворы солей (хлоридов) меди и кадмия (концентрация приведена в пересчете на катион): группа 1–5 мкг/л Cu^{2+} , группа 2–50 мкг/л Cu^{2+} , группа 3 – 250 мкг/л Cu^{2+} , группа 4 – 10 мкг/л Cd^{2+} , группа 5 – 100 мкг/л Cd^{2+} , группа 6–500 мкг/л Cd^{2+} . Контролем служили моллюски, содержащиеся в аквариуме без добавления металлов (группа 7). Время экспозиции составляло одни и трое суток, а затем из каждой группы отбирали для дальнейшего изучения по 7 особей. До начала эксперимента жабры и гепатопанкреас замораживали и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Активность лизосомальных протеиназ, катепсинов В и D, определяли спектрофотометрически (Алексеев, 1968) по гидролизу белковых и пептидных субстратов. Активность ферментов выражали в единицах поглощения при 280 нм (катепсин D) и 525 нм (катепсин В) на мг белка. Концентрацию тканевых белков определяли методом Брэдфорд, (Bradford, 1976).

На основании полученных данных по изменению содержания белка и активности катеп-

синов в тканях мидий при воздействии исследуемых металлов, можно сделать следующие выводы.

Возрастает удельная активность катепсина В в гепатопанкреасе мидий, помещенных в аквариумы с различным разведением меди при разведении 5 мкг/л, затем уровень активности фер-

мента снижается при 50 мкг/л и вновь повышается (особенно в 1 сутки эксперимента) при максимальной концентрации металла – 250 мкг/л. В жабрах активность катепсина В снижается при разведении 5,50 мкг/л и резко возрастает при максимальных (250 мкг/л) концентрациях меди (рис. 1).

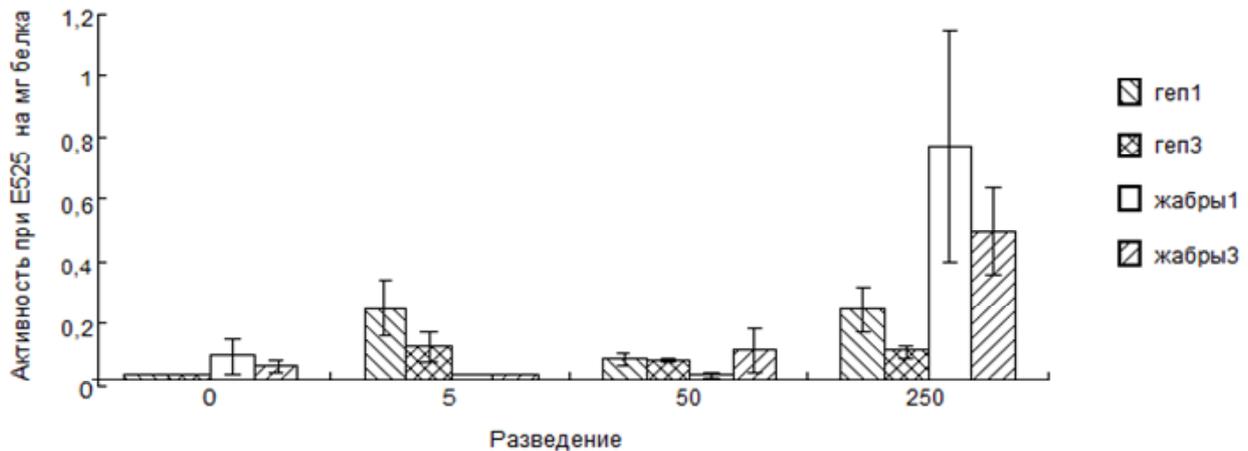


Рис. 1. Влияние аккумуляции меди (концентрация 5, 50, 250) мг на активность катепсина В в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₅₂₅ на мг белка

Активность катепсина D в изученных органах мидий повышается как при экспозиции в 1, так и в 3 суток. Исключением являются жабры, в которых в первые сутки при разведении металла до 5 мкг/л активность возрастает в 5 раз и

резко снижается через 3 суток. При максимальном разведении соли меди (250 мкг/л) активность данного фермента превышает уровень контрольных значений в 2–3 раза как в гепатопанкреасе, так и в жабрах мидий (рис. 2).

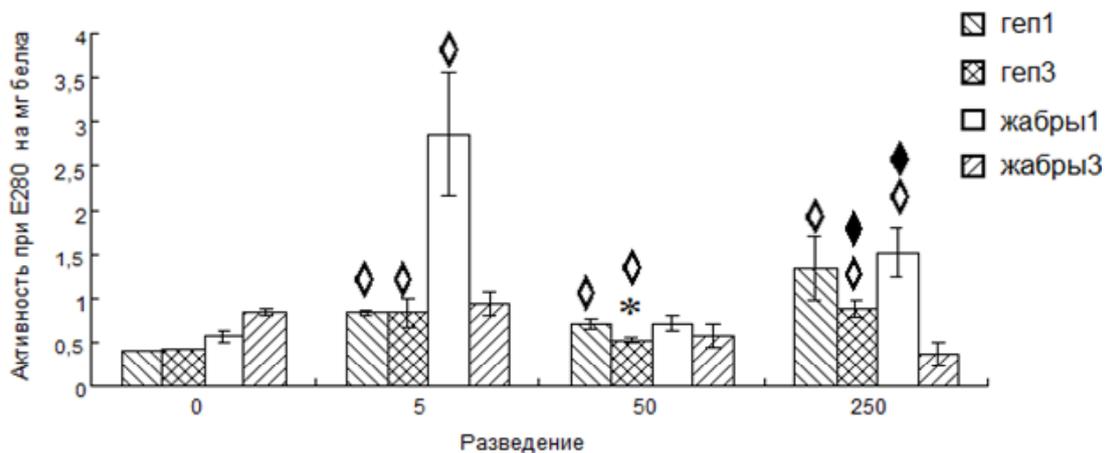


Рис. 2. Влияние аккумуляции меди (концентрация 5, 50, 250) мг на активность катепсина D в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₂₈₀ на мг белка

Условные обозначения: * – различия между временем инкубации достоверны; ♦ – различия достоверны при сравнении с контролем; ◆ – различия достоверны между разведением ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона – Манна – Уитни)

Активность цистеинзависимой (или тиоловой) протеиназы лизосом – катепсина В в гепатопанкреасе и жабрах мидий, помещенных в ак-

вариумы с разбавлением солей кадмия, значительно снижена по сравнению с контролем и с аналогичным экспериментом с использованием

солей меди. Наиболее выраженные изменения уровня активности данного фермента обнаружены в гомогенатах жабр у мидий в аквариумах с разведением 10, 100 мкг/л (экспозиция 3 суток)

и наблюдается особенно резкое падение активности катепсина В в жабрах мидий в аквариумах с максимальным разведением соли кадмия (рис. 3).

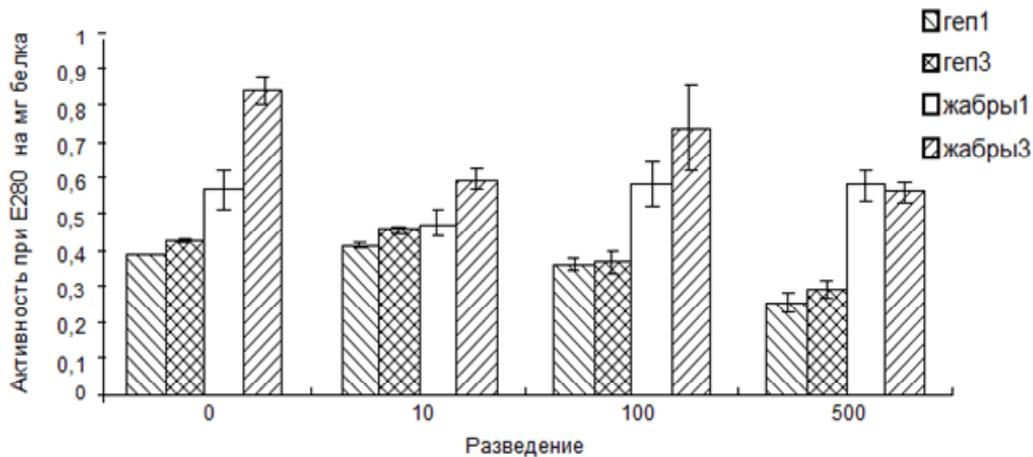


Рис. 3. Влияние аккумуляции кадмия (концентрация 10, 100, 500) мг на активность катепсина В в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₅₂₅ на мг белка

Активность катепсина D в гепатопанкреасе мидий почти не зависит от времени экспозиции с кадмием и несколько снижается при концентрации металла 500 мг/л. В жабрах мидий ак-

тивность фермента немного выше при 3-суточной экспозиции при концентрациях металла до 10 и 100 мг/л и эти различия исчезают при концентрации кадмия 500 мг/л (рис. 4).

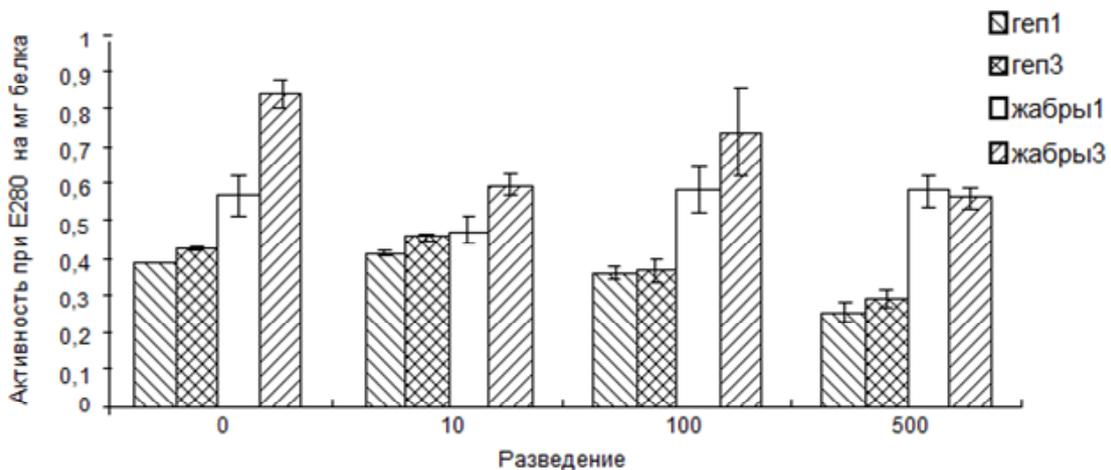


Рис. 4. Влияние аккумуляции кадмия (концентрация 10, 100, 500) мг на активность катепсина D в гомогенатах гепатопанкреаса и жабр мидий (экспозиция 1, 3 суток) при E₂₈₀ на мг белка

Ингибирование цистеинзависимых ферментов не только снижает скорость белкового обмена и реакций, регулируемых этими ферментами, но и подавляет защитную роль лизосом, так как уже указывалось, что ферменты лизосом принимают участие в процессах экскреции и детоксикации низких доз катионов тяжёлых металлов (Чекунова, Фролова, 1986).

Активность лизосомальной аспартильной протеиназы катепсина D прямо не зависит от ковалентного связывания реакционных групп активного центра с металлами, его реактивность в этих условиях может быть связана с участием фермента в детоксикации и иммунных процессах в лизосомах.

Таким образом, было установлено, что активность лизосомальных протеиназ изменяется в

зависимости от типа действующего металла, его концентрации и времени воздействия. По совокупности наблюдений, очевидно, что присутствие меди стимулирует компенсаторные изменения, в то время как кадмий угнетающе действует на кальций-зависимый протеолиз.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Программы Президента «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4, РФФИ № 08-04-01140-а, Программы Президиума РАН «Биоразнообразие 2009–2011 гг.».

Литература

Алексеев Л. П. Определение активности протеолитических ферментов / Л. П. Алексеев // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина. – 1968. – С. 115–130

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.

Мосолов В. В. Механизмы контроля протеолиза / В. В. Мосолов // Успехи биол. химии. 1988. – Т. 28. – С. 125–144.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб / Н. Н. Немова. – Петрозаводск: Изд-во КНЦ РАН, 1996. – 121 с.

Немова Н. Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. – М: Наука, 2005. 161 с.

Немова Н. Н., Сидоров В. С. Внутриклеточное распределение и активность катепсинов в яйцах сига до и после оплодотворения // Онтогенез. 1980, № 1. С. 85–87.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Изменение ферментов лизосом при белковой недостаточности // Биохимия. 1968. Т. 33. N 4. С. 809–816.

Чекунова М. П., Фролова А. Д. Роль лизосом в токсикологии металлов // Структура и функции лизосом: Тез. Докл. 3-го Всесоюз. симпоз. Тбилиси: ХОЗУ Минуралсибстроя СССР, 1984. С. 228–229.

Braedford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analit. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

Moore M.N. Cellular responses to pollutant // *Mar. Pollut. Bull.* 1985. Vol. 16. P. 134–139.

Nemova N., Bogdan V., Smirnov L. et al. Biochemical indication of mercury accumulation in fish // *Toxicol. And Pharmacol.* 2004. Vol. 197, N 3. P. 273.

INFLUENCE OF HEAVY METALS (CD, CU) ON THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL PROTEINASES MUSSEL *MYTILUS EDULIS* L.

M.Y. Krupnova, N.N. Nemova, V.S. Skidchenko

*Institute of biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russia*

Activity of lysosomal proteinases varies depending on the type of active metal, its concentration and exposure time. On set of observations, it is obvious

that the presence of copper stimulates compensatory changes, while cadmium depressing effect on calcium-dependent proteolysis.

ВЛИЯНИЕ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ И НИЗКОЧАСТОТНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА *RUTILUS RUTILUS* (L.) (СРАВНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ)

В. В. Крылов, Ю. Г. Изюмов, Ю. В. Чеботарева

Учреждение Российской академии наук, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
п. Борок, Ярославская обл., Россия,
e-mail: kryloff@ibiw.yaroslavl.ru

Введение

Накоплено большое количество информации о влиянии искусственных низкочастотных магнитных полей (МП) на темпы раннего развития, морфологические и биохимические показатели у различных биологических объектов (Бинги, 2002; Simko, 2007). Известно о влиянии естественных низкочастотных флуктуаций геомагнитного поля – магнитных бурь (МБ) на различные параметры живых систем. Экспериментальное изучение МБ довольно сложная задача, публикации по этой тематике сводятся к обнаружению корреляций между случившейся магнитной бурей и наблюдаемым явлением (Мартынюк и др., 2008). При сходной природе, указанные выше факторы имеют свои особенности. Искусственные низкочастотные МП, используемые в экспериментах, чаще всего генерируются с определёнными неизменными параметрами, тогда как МБ – это сложные комбинации сменяющих друг друга параметров флуктуирующего магнитного поля. Сравнительного описания биологической эффективности этих двух факторов с использованием одних и тех же объектов и подходов нами не обнаружено.

Цель работы – изучить влияние МБ и низкочастотных МП на ранний онтогенез *Rutilus rutilus* (L.) и сравнить полученные экспериментальные данные.

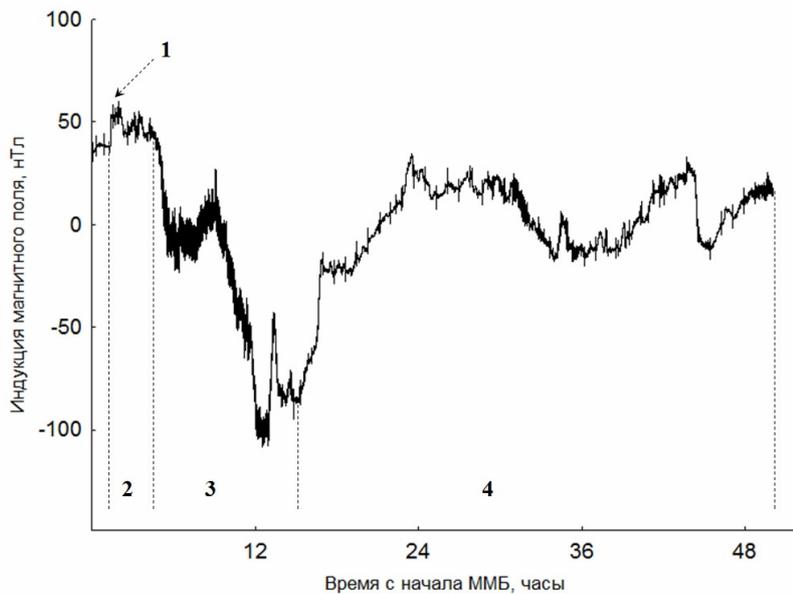
В экспериментах была использована плотва из Рыбинского водохранилища, которая практически не испытывала на себе влияния МП антропогенного происхождения. Это отличает работу от большинства экспериментальных исследований с использованием лабораторных культур, которые могут подвергаться модификации в процессе длительного культивирования (Krylov et al., 2011).

Материалы и методы

Моделирование Н-компоненты типичной МБ: Эксперименты проводились во время спокойной геомагнитной обстановки. Геомагнитная обстановка оценивалась по данным, представленным на сайте ИЗМИРАН. МБ создавалась в рабочем объёме пары колец Гельмгольца. Реальный сигнал Н-компоненты магнитной бури воспроизводился в диапазоне частот 0–5 Гц. Направление магнитного поля МБ совпадало с направлением Н-компоненты, а величина складывалась с соответствующей компонентой естественного магнитного поля Земли. Общая структура типичной магнитной бури постоянна. В качестве модели, была использована запись МБ в Киото 28–30 декабря 1976 года, в ее динамике выделялись характерные фазы: внезапное начало, начальная фаза, главная фаза и фаза восстановления (рис.).

Генерация МП: В экспериментах использовались синусоидальные ЭМП. Сигналы создавались в генераторе ГЗ-102 и поступали на кольца Гельмгольца, диаметром 30 см, в рабочем объёме которых проводились опыты. Кольца располагались в горизонтальной плоскости, эксперименты проводились на фоне геомагнитного поля. Оценивалось действие МП с величиной индукции 150 μT (приблизительно на порядок больше флуктуаций поля во время МБ) и частотой 72,5 Гц. А также МП с величиной индукции 75 μT и частотой 500 Гц.

Структура экспериментов: Эксперименты проводились в разные годы. Объектом экспозиции в МП и МБ была икра плотвы. Половые продукты получали от производителей, пойманных неводом на нерестилище. Осеменение проводилось сухим способом, после чего икру помещали в кристаллизаторы с речной водой, ко-



Модельный сигнал Н-компоненты магнитной бури: 1 – внезапное начало, 2 – начальная фаза, 3 – главная фаза, 4 – фаза восстановления

торую меняли дважды в сутки. Рассматривались следующие экспериментальные варианты: МП1 – экспозиция икры в МП 72,5 Гц, 150 μT с оплодотворения до гастрюляции; МП2 – экспозиция икры в МП 500 Гц, 75 μT с оплодотворения до вылупления предличинок; МП3 – экспозиция икры в МП 500 Гц, 75 μT с оплодотворения до гастрюляции; МБ1 – экспозиция икры с оплодотворения до органогенеза в МБ с фазы внезапного начала до завершения; МБ2 – экспозиция икры с оплодотворения до гастрюляции в МБ с фазы восстановления до завершения. Кристаллизатор с контрольной икрой находился в условиях естественного магнитного поля. При смене воды подсчитывалось число живых икринок. Личинок из контрольных и опытных вариантов после рассасывания желточного мешка помещали в пруды с естественной кормовой базой на 4 месяца. Смертность плотвы в прудах была минимальна.

У сеголеток определяли массу тела и измеряли длину от конца рыла до конца чешуйного покрова; подсчитывали общее число позвонков (*Vert*), число позвонков в грудном (*Va*), переходном (*Vi*) и хвостовом (*Vc*) отделах. Признаки осевого скелета рассматривали как независимо, так и в виде сочетаний, характеризующих число позвонков в каждом отделе в порядке *Va–Vi–Vc*. Исследовали также изменчивость формулы глоточных зубов. Показателем стабильности развития служила дисперсия флуктуирующей асимметрии σ^2_s (Захаров, 1987), которую определяли для числа отверстий каналов сейсмочувствительной системы в парных костях черепа – *dentale*, *frontale* и *praeperculum*. Оценивали также внут-

рипопуляционное разнообразие с помощью индекса Животовского (μ) (Животовский, 1991). Разницу в динамике смертности икры оценивали с помощью критерия знаков. Достоверность различий средних значений с помощью критерия Стьюдента, при оценке малых долей использовали угловую трансформацию по Фишеру. Дисперсии флуктуирующей асимметрии оценивали с помощью критерия Фишера. Для оценки связи морфологических и морфометрических признаков использовали корреляционный анализ.

Результаты исследований

Мы рассмотрим те показатели, которые были показательными при сравнении эффектов МП и МБ. При инкубации икры в МП разница в выживаемости между контролем и опытом была незначимой в вариантах МП2 и МП3; в варианте МП1 наблюдалось достоверное увеличение смертности (разница по отношению к контролю составила 9,87%). При инкубации икры в МБ разница в выживаемости икры между контролем и опытом в обоих вариантах была незначима.

Вылупление предличинок во всех вариантах, экспонировавшихся в МП, проходило синхронно с контролем. Вылупление предличинок, экспонировавшихся в МБ1 проходило более интенсивно по сравнению с контролем, где этот процесс был растянут во времени. Смертность вылупившихся предличинок до их посадки в пруды во всех экспериментах была минимальной.

Действие МП и МБ в раннем онтогенезе приводило к достоверному снижению размерно-массовых показателей у сеголетков во всех экспериментальных вариантах за исключением рыб, экспонировавшихся в МП1, где наблюдали противоположный эффект (табл. 1).

К сожалению, у нас нет информации о влиянии изучаемых факторов на число лучей в плавниках в вариантах МП2 и МП3. Но хотелось бы отметить, что действие МП1 на плотву в раннем онтогенезе приводило к достоверному уменьшению числа лучей в брюшных плавниках у экспериментальных сеголетков по сравнению с контрольными (значение в контроле (здесь и далее

$M \pm m$) $8,13 \pm 0,03$, в опыте $8,01 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Действие МБ1 приводило к увеличению количества лучей в брюшных плавниках у опытных сеголетков по сравнению с контролем (значение в контроле $8,16 \pm 0,03$, в опыте $8,34 \pm 0,04$, $p < 0,001$). Действие МБ2 не вызывало достоверных изменений в числе лучей в плавниках.

Влияние МП и МБ на общее количество позвонков и количество позвонков в отделах позвоночника показано в таблице 2. Достоверные изменения общего количества позвонков наблюдалось только в эксперименте с МП2. В экспериментах с МБ заметны перераспределения позвонков по отделам.

Таблица 1. Длина и масса сеголетков плотвы после экспозиции икры в МП и МБ

Вариант	Длина, мм	Масса, г	n
МП 1	69.92 ± 0.48 *	6.12 ± 0.14 *	63
	75.05 ± 0.44	7.95 ± 0.14	80
МП 2	71.13 ± 0.57 *	4.98 ± 0.13 *	24
	59.29 ± 0.54	2.75 ± 0.10	24
МП 3	76.55 ± 0.37 *	8.04 ± 0.24 *	30
	66.40 ± 0.29	5.05 ± 0.14	30
МБ 1	65.64 ± 0.29 *	5.15 ± 0.05 *	154
	59.16 ± 0.19	3.67 ± 0.03	137
МБ 2	62.71 ± 0.28 *	4.39 ± 0.06 *	107
	61.22 ± 0.20	4.17 ± 0.04	151

Здесь и далее: * – различия достоверны относительно контроля при $p < 0,05$. В числителе приведено значение признака из контрольного варианта, в знаменателе – из экспериментального.

Таблица 2. Число позвонков у сеголетков плотвы после экспозиции икры в МП и МБ

Вариант	Va	Vi	Vc	Vert	n
МП 1	16.66 ± 0.08	3.07 ± 0.06	15.26 ± 0.07	41.98 ± 0.10	82
	16.53 ± 0.07	3.09 ± 0.06	15.36 ± 0.06	41.98 ± 0.09	98
МП 2	16.16 ± 0.06	2.91 ± 0.05	15.05 ± 0.05 *	41.12 ± 0.07 *	80
	16.12 ± 0.07	2.98 ± 0.05	15.25 ± 0.08	41.35 ± 0.10	80
МП 3	16.96 ± 0.07	2.62 ± 0.07 *	15.17 ± 0.05	41.75 ± 0.07	97
	16.73 ± 0.09	2.86 ± 0.06	15.12 ± 0.07	41.72 ± 0.10	104
МБ 1	16.10 ± 0.04	3.07 ± 0.04 *	14.98 ± 0.04 *	41.15 ± 0.04	154
	16.15 ± 0.04	2.87 ± 0.04	15.18 ± 0.04	41.20 ± 0.04	137
МБ 2	16.34 ± 0.05 *	2.89 ± 0.05	15.53 ± 0.05 *	41.74 ± 0.05	107
	16.52 ± 0.05	2.87 ± 0.05	15.32 ± 0.04	41.71 ± 0.05	151

Изменения числа отверстий сейсмочувствительной системы и значений дисперсии флуктуирующей асимметрии для парных костей черепа отражены в таблице 3. Все достоверные изменения дисперсии флуктуирующей асимметрии в экспериментальных вариантах были направлены в сторону снижения значений относительно контроля. Заметно увеличение числа отверстий сейсмочувствительной системы в нижнечелюстных костях после действия МП и МБ во время раннего онтогенеза.

Действие МП2 и МП3 в раннем онтогенезе приводило к формированию достоверно более разнообразных позвонковых фенотипов (табл. 4). Индекс Животовского не показал однозначной реакции плотвы в ответ на экспозицию икры в МБ.

После действия МП на раннее развитие плотвы наблюдалось значимое увеличение доли рыб с аномалиями в позвоночнике в вариантах МП1 (разница между контролем и опытом $16,1\%$, $p < 0,05$) и МП2 (разница между контролем и

опытом 14%, $p < 0,05$). В варианте МП3 наблюдалось уменьшение количества особей с аномалиями в позвоночнике (разница между контролем и опытом 4%), однако отличия от контроля были недостоверны. После действия МБ на раннее развитие плотвы наблюдалось уменьшение

количества особей с различными аномалиями осевого скелета. МБ1 вызывала достоверный биологический эффект (разница между контролем и опытом 17,5%, $p < 0,05$), эффект после воздействия МБ2 был статистически незначимым (разница между контролем и опытом 8,8%).

Таблица 3. Показатели развития сейсмочувствительной системы в парных костях черепа у сеголетков плотвы после экспозиции икры в МП и МБ

Вариант	<i>frontale</i>		<i>dentale</i>		<i>praeoperculum</i>		<i>n</i>
	Число отверстий	σ_s^2	Число отверстий	σ_s^2	Число отверстий	σ_s^2	
МП 1	5.27 ± 0.05	0.74^*	$2.87 \pm 0.07^*$	1.18^*	8.14 ± 0.07	0.95	82
	5.17 ± 0.05	0.50	3.43 ± 0.05	0.82	8.04 ± 0.06	0.87	98
МП 2	$5.40 \pm 0.04^*$	0.58	$2.73 \pm 0.07^*$	1.16	$8.13 \pm 0.07^*$	0.86	80
	5.57 ± 0.05	0.47	3.46 ± 0.06	0.84	7.73 ± 0.07	0.78	80
МП 3	5.35 ± 0.05	0.77^*	$3.16 \pm 0.06^*$	0.85	8.14 ± 0.06	1.22	97
	5.46 ± 0.04	0.47	3.66 ± 0.05	0.79	8.18 ± 0.06	1.16	104
МБ 1	5.28 ± 0.05	0.64	3.66 ± 0.05	0.68	8.46 ± 0.08	1.20	151
	5.24 ± 0.06	0.56	3.68 ± 0.05	0.77	8.49 ± 0.08	1.19	136
МБ 2	$5.19 (\pm 0.06)$	0.66^*	$1.96 \pm 0.10^*$	1.33^*	$7.77 \pm 0.09^*$	1.27	97
	$5.08 (\pm 0.04)$	0.40	3.17 ± 0.06	0.68	7.97 ± 0.06	1.01	148

Таблица 4. Разнообразие распределений признаков осевого скелета у сеголетков плотвы по Животовскому (Индекс Животовского (μ) \pm стандартная ошибка)

Вариант	<i>Va-Vi-Vc</i>	<i>Va</i>	<i>Vi</i>	<i>Vc</i>	<i>Vert</i>	<i>n</i>
МП 1	14.56 ± 0.89	3.24 ± 0.20	2.66 ± 0.12	2.48 ± 0.14	4.16 ± 0.24	82
	16.46 ± 0.96	3.15 ± 0.17	2.88 ± 0.18	2.92 ± 0.18	4.18 ± 0.19	98
МП 2	$9.21 \pm 0.74^*$	$2.55 \pm 0.21^*$	2.32 ± 0.14	$2.39 \pm 0.13^*$	$2.98 \pm 0.19^*$	80
	15.06 ± 1.06	3.34 ± 0.26	2.40 ± 0.13	3.39 ± 0.26	4.21 ± 0.31	80
МП 3	$15.35 \pm 0.95^*$	$3.35 \pm 0.15^*$	3.13 ± 0.17	$2.75 \pm 0.19^*$	$3.25 \pm 0.16^*$	97
	23.78 ± 1.19	4.54 ± 0.25	3.08 ± 0.17	3.76 ± 0.28	5.14 ± 0.30	104
МБ 1	$7.85 \pm 0.51^*$	2.57 ± 0.15	2.46 ± 0.09	2.29 ± 0.10	2.43 ± 0.16	151
	6.42 ± 0.46	2.27 ± 0.11	2.23 ± 0.11	2.25 ± 0.11	2.21 ± 0.11	136
МБ 2	$9.28 \pm 0.57^*$	2.40 ± 0.12	2.50 ± 0.11	2.65 ± 0.18	2.81 ± 0.18	107
	11.24 ± 0.65	2.78 ± 0.15	2.60 ± 0.13	2.43 ± 0.10	3.01 ± 0.14	151

Корреляционный анализ показал, что в экспериментах с МП всем вариантам присуща достоверная положительная связь между числом позвонков и числом аномалий в позвоночнике. В экспериментах с МБ таких корреляций обнаружено не было.

Обсуждение результатов

Изменения физиологических и биохимических показателей в ответ на действие МП в раннем онтогенезе различных биологических объектов могут приводить к формированию фенотипов, отличных от контроля. Известно, что действие слабых низкочастотных МП на биологические системы описывается нелинейно и зависит от частоты и амплитуды поля (Бинги, 2002). Параметры МП и МБ, использованных в

наших экспериментах, заметно различаются, в частности по интенсивности МП были на порядок выше МБ. Поэтому в ряду изученных показателей некоторые биологические эффекты действия МП были отличны или противоположны эффектам действия МБ.

К таким эффектам относятся различия в количестве лучей в брюшных плавниках после действия изучаемых факторов в раннем онтогенезе. Эти данные интересны, прежде всего, тем, что число лучей в брюшных плавниках довольно стабильный признак для плотвы. Различия между МП и МБ прослеживаются также при сравнении числа рыб с аномалиями осевого скелета, индексов разнообразия распределения признаков осевого скелета и корреляций между числом позвонков и числом аномалий в позвоночнике у сеголетков плотвы.

Влияние МП и МБ на общее количество позвонков и на количество позвонков в различных отделах позвоночника не имеет выраженных тенденций. Формирование метамерных элементов скелета, определяющих окончательное количество позвонков, происходит после гастрюляции (Павлов, 2007). Это подтверждается тем, что действие МП (500 Гц, 150 μ T) на икру плотвы с момента гастрюляции до вылупления предличиночек влияет на общее количество позвонков и число позвонков в хвостовом отделе позвоночника (Чеботарёва и др., 2009). В приведённых экспериментах сеголетки из варианта МП2 испытывали на себе действие поля после гастрюляции, что также сказалось на общем количестве позвонков и числе позвонков в хвостовом отделе позвоночника.

Можно выделить ряд сходных биологических эффектов в результате действия МП и МБ на ранний онтогенез плотвы. Это снижение размерно-массовых показателей, увеличение числа

отверстий сейсмодатчика системы в нижнечелюстных костях и общая тенденция к снижению дисперсии флуктуирующей асимметрии числа отверстий сейсмодатчика системы в парных костях черепа у сеголетков. Вероятно, эти эффекты не обладают специфичностью по отношению к параметрам применяемого слабого низкочастотного магнитного воздействия и представляют собой своего рода маркеры или характерные признаки такого влияния.

Мы полагаем, что в основе описанных изменений могут лежать модификации биохимических процессов под влиянием МП или МБ во время раннего развития. Дальнейшие исследования, запланированные в этом направлении, помогут более подробно разобраться в механизмах возникновения подобных биологических эффектов.

Исследования поддержаны грантом Президента РФ. Грант МК-239.2009.4.

Литература

Бинги В. Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. М.: Изд-во МИЛТА, 2002. 592 с.

Животовский Л. А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.

Захаров В. М. Асимметрия животных. М.: Наука, 1987. 216 с.

Мартынюк В. С., Темуриянц Н. А., Владимирский Б. М. У природы нет плохой погоды: космическая погода в нашей жизни. Киев: Изд-во Mavis, 2008. 178 с.

Павлов Д. А. Морфологическая изменчивость в раннем онтогенезе костистых рыб. М.: ГЕОС, 2007. 264 с.

Чеботарева Ю. В., Изюмов Ю. Г., Крылов В. В. Влияние переменного электромагнитного поля на раннее развитие плотвы *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes) // *Вопр ихтиологии*. 2009. Т. 49. С. 422–428.

Krylov V.V., Izyumov Y.G., Osipova E.A. Adaptive modifications in *Daphnia* (water flea) caused by low-frequency magnetic field // *Bioelectromagnetics*. 2011. (in print).

Simko M. Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects // *Curr Med Chem*. 2007. V. 14(10). P. 1141–1152.

ACTION OF TYPICAL MAGNETIC STORM AND WEAK LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELDS ON *RUTILUS RUTILUS* (L.) (COMPARISON OF THE EXPERIMENTAL DATA)

V.V. Krylov, Yu.G. Izyumov, Yu.V. Chebotareva

I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia
e-mail: kryloff@ibiw.yaroslavl.ru

Action of the weak low-frequency magnetic fields (MF) and certain phases of the magnetic storm (MS), created along the H-component of geomagnetic field, on roach *Rutilus rutilus* were studied. Fertilized eggs were exposed. After the exposure, share of fishes with abnormalities of the axial skeleton, number of rays in ventral fin, indexes of morphological diversity and correlations between number of vertebrae and

number of abnormalities in fingerlings showed differences between MF and MS action. Some similar biological effects of MF and MS action were found out: decrease of size-weight characters, increase of the number of openings of seismosensory system canals in dentale bone and tendency toward decreasing of dispersion of fluctuating asymmetry in the paired bones of cranium.

ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА ОСНОВЕ ИХ КАРДИОАКТИВНОСТИ И ДВИГАТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Т. В. Кузнецова¹, В. В. Трусевич², А. С. Куракин¹, С. В. Холодкевич¹ А. В. Иванов¹

¹Научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

²Карадагский природный заповедник НАН Украины, г. Феодосия, Украина

e-mail: kuznetsova_tv@bk.ru

Введение

Физиологические адаптации организмов проявляются на различных уровнях организации: от клеточного до организменного. Эти адаптации направлены на:

- сохранение целостности организма и функциональной активности его макромолекул, а также надмолекулярных комплексов (мембран, хромосом, рибосом);
- на обеспечение организма источниками энергии и питательными веществами, используемыми для биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов, составляющих ткани организма и являющихся запасами питательного материала;
- на поддержание регуляторных механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от непостоянных условий среды;
- на развитие приспособительных реакций у живых организмов, стоящих на различных ступенях эволюционного развития в ответ на воздействие разнообразных факторов среды.

Функциональные адаптации определяют степень устойчивости и чувствительности исследуемых видов к внешним воздействиям. Таким образом, изменение функций организма, возникающее в процессе физиологической адаптации, отражает ответ организма (различных его систем) на изменения факторов внешней среды.

Целью данной работы являлось изучение проявления функциональных адаптаций двустворчатых моллюсков на основе регистрации кардиоактивности и движения их створок.

Материал и методы

Объектом данного исследования были 2–3-летние черноморские двустворчатые моллюски – мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., собранные в районе Карадагского природного заповедника НАН Украины и в окрестностях г. Севастополя. Часть экспериментальной работы была проведена в аквариальных помещениях заповедника, часть – *in situ* – в бухте Карадагского заповедника и в бухте Казачья г. Севастополя.

В лабораторных опытах мидий предварительно акклиматизировали к условиям лабораторного содержания в течение 2-х недель. Опыты проводили при температуре проточной морской воды +19–19,5 °С. Часть лабораторных экспериментов была проведена на беломорских мидиях – *Mytilus edulis* L. в лаборатории экспериментальной экологии водных систем НИЦЭБ РАН (Санкт-Петербург). В этом случае температуру воды поддерживали в пределах +10–11 °С.

В качестве показателей функционального состояния мидий использовали характеристики кардиоактивности (частоту сердечных сокращений – ЧСС и среднеквадратичное отклонение в выборке из 50 кардиоинтервалов) и величину раскрытия створок, отражающую основную двигательную активность этих моллюсков.

Кардиоактивность измеряли с помощью оригинального лазерного волоконно-оптического 7-канального фотоплетизмографа (Kholodkevich et al., 2007), что обеспечивало одновременную регистрацию ЧСС 7 мидий. Движение створок тех же мидий регистрировали с помощью специального комплекса автоматизированной регистрации движений створок моллюсков, разработанного и изготовленного в ИнБЮМ НАН Украины (Столбов и др., 2004). Используемый датчик

движения створок, основанный на эффекте Холла, широко применяется в биомониторинговых исследованиях за рубежом (www.mosselmonitor.nl). Описание примененного в данной работе погружного измерительного модуля, в котором объединены системы неинва-

зивного отведения кардиоактивности и движения створок мидий приведено в нашем сообщении (Холодкевич и др., 2008а).

Блок-схема регистрации кардиоактивности и методика обработки данных представлена на рис. 1.

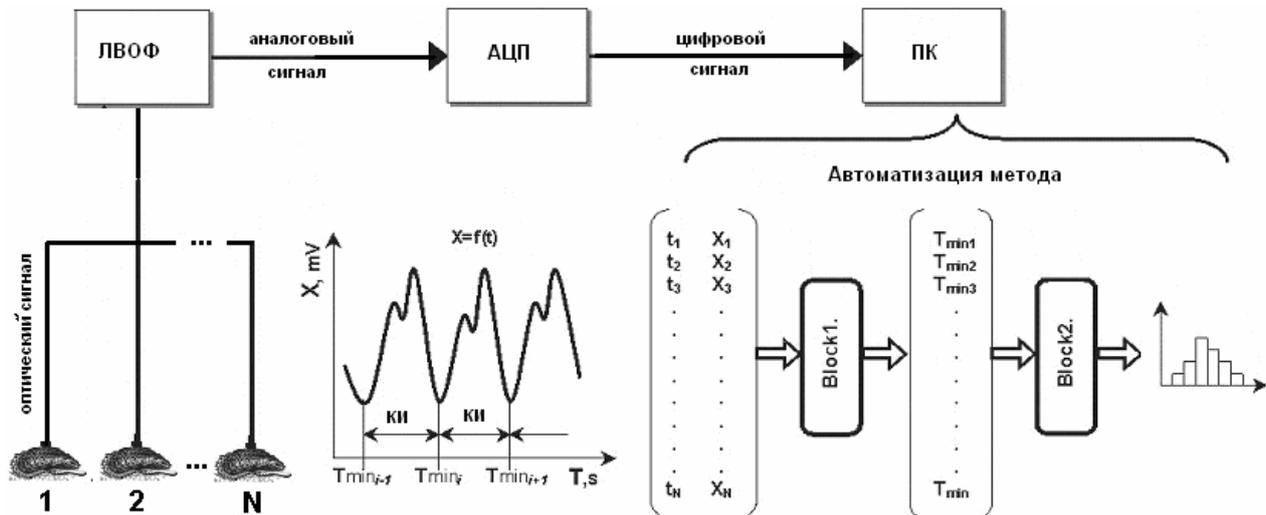


Рис. 1. Схема экспериментальной установки по регистрации частоты сердечных сокращений бентосных беспозвоночных и компьютерная обработка полученных данных в режиме on-line.

Обозначения: ЛВОФ – лазерный волоконно-оптический фотоплетизмограф, АЦП – аналого-цифровой преобразователь, ПК – персональный компьютер, KI – межимпульсные кардиоинтервалы (сек)

В задачи исследования входило:

1. Разработать методики неинвазивной регистрации движения створок и кардиоактивности двустворчатых моллюсков (преимущественно мидий) для их одновременной записи и анализа в режиме on-line в условиях *in situ* и в лабораторных экспериментах.

2. Изучить двигательные реакции мидий и характеристики их кардиоактивности при изменении основных абиотических факторов среды (температуры и солености воды).

3. Выявить наиболее важные характеристики проявления функциональных адаптаций мидий к изменяющимся факторам среды обитания (в том числе при действии токсикантов) на основе регистрации и анализа их кардиоактивности и движения створок.

Результаты и их обсуждение

Изучению биологических ритмов по-прежнему уделяется большое внимание исследователей. Анализ имеющихся фактов, подтверждает мнение о ведущей сигнальной роли световых и температурных факторов среды в осуществлении ритмики физиологических функций организма

(Ашофф, 1984; Ding et al., 1998 и др). В связи с этим, естественно, возникла необходимость изучения проявления ритмической активности в функционировании основных систем моллюска – двигательной и сердечно-сосудистой.

Исследования суточной динамики движения створок моллюсков в условиях естественной среды обитания, а также в аквариумных условиях содержания показали определенные различия в ритмической организации двигательных актов и в кардиоактивности моллюсков, содержащихся в неволе и в море.

В естественных условиях обитания в движении створок мидий наблюдался ярко выраженный суточный ритм, с особенностями ночного и дневного периода активности (рис. 2). Переходы от ночного периода к дневному и обратно точно совпадали с моментом восхода и захода Солнца и осуществлялись в течение 5–10 мин.

Ночной период активности характеризуется большей амплитудой раскрытия створок и частотой схлопывания (аддукция) – 3–4 раза в час, в естественных условиях обитания. Величина раскрытия створок у разных животных колебалась в широких пределах и у *M. galloprovincialis* Lam. 2–3-х летнего возраста достигала 7–8 мм и более.

Дневной период активности характеризуется меньшей величиной амплитуды раскрытия створок и частотой аддукции 1 раз в 2–3 часа. Аддук-

ция – быстрое закрытие до 0 мм и последующее раскрытие створок до исходной величины, совершаемое мидией в течение 2-х – 2,5 мин.

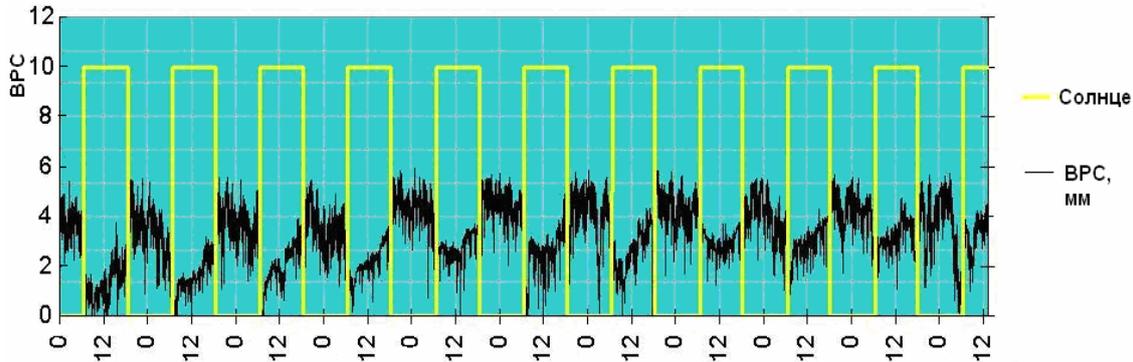


Рис. 2. Суточная динамика движения створок мидий (усредненная по 7 мидиям) в условиях регистрации *in situ* и уровень освещения (Солнце) в соответствии с местным зенитом. BPC – величина раскрытия створок в мм

Особенности двигательных актов створок и их паттерн у моллюсков могут варьировать в широких пределах, имеют ярко выраженный индивидуальный характер, сохраняя при этом, у моллюсков, собранных в чистых акваториях, четкую суточную ритмику.

В суточном ритме движений створок мидий в естественных условиях отмечаются также периоды продолжительного, от нескольких десятков минут до 1–1,5 часов, полного закрытия створок, определяемого различными исследователями как период «сна», «расслабления» или «отдыха». Эти периоды «отдыха» в наших наблюдениях у разных моллюсков проявлялись в различное время, хотя чаще – в конце ночного или дневного периода суток. Напротив, при содержании мидий в аквариальных условиях, начиная с 4–5-х суток и далее, постепенно нарастают изменения характера и ритма движения створок: начинают уча-

щаться и удлиняться периоды «отдыха», постепенно достигая от нескольких часов до суток и более. Эти периоды прерываются постепенно все более редкими кратковременными всплесками активности движений створок с меньшей амплитудой раскрытия створок, при этом постепенно нарушается суточный ритм движения створок. Такой характер изменений движений створок моллюсков наблюдался рядом исследователей при ухудшении условий питания мидий (Ortmann, Grieshaber, 2003). В ранее проведенных исследованиях (Трусевич и др., 2006) показано, что ритмика движения створок мидий может существенно нарушаться в результате острого токсического воздействия, например, действия детергента SDS (рис. 3). В условиях длительного лабораторного содержания мидий мы наблюдали сходное явление, однако его природа требует дополнительного изучения.

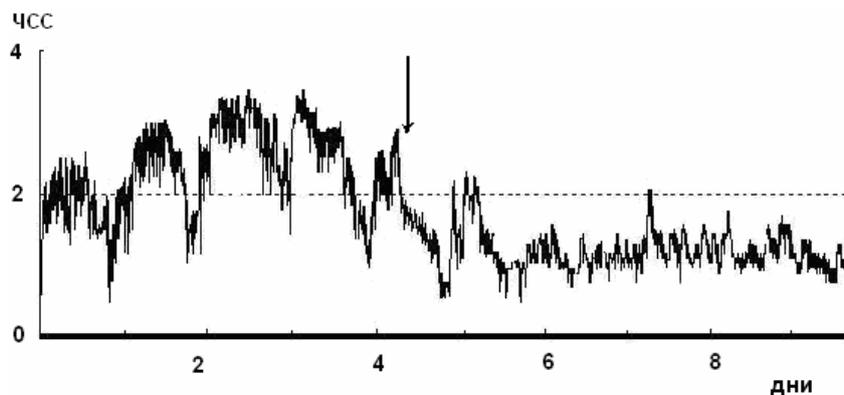


Рис. 3. Нарушение циркадности в движении створок мидий после подачи в экспериментальный аквариум детергента SDS. Стрелкой указано начало подачи токсиканта. Пояснения в тексте

Суточный ритм в кардиоактивности (анализировали среднюю ЧСС в выборке из 50 последовательных кардиоинтервалов) мидий был отмечен нами в

условиях регистрации в открытом море (Карадагский заповедник). Этот процесс явно имеет связь с динамикой изменения температуры воды (рис. 4).

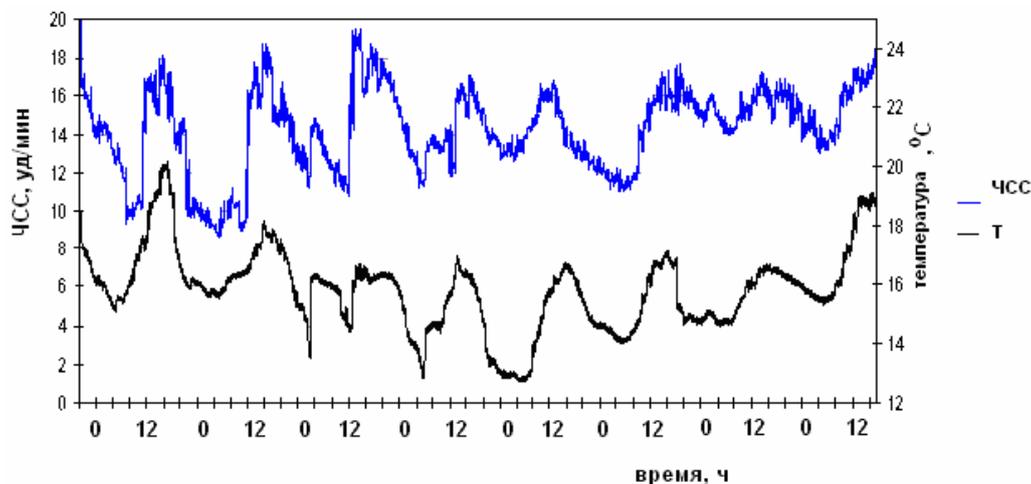


Рис. 4. Суточный ритм в ЧСС мидий и изменение температуры воды в море в условиях непрерывной многодневной регистрации

Особое место в исследованиях физиологических и поведенческих реакций животных в нашей работе было уделено выявлению ультрадианных ритмов (Холодкевич и др., 2009, б), поскольку они отражают особенности протекания основных физиологических процессов, могут характеризовать механизмы краткосрочных физиологических адаптаций организма животных и осуществляться на разных уровнях их организации (Stupfel et al., 1985; Edgar, Lehner, 1996; Rodland et al., 2006). Отметим, что в работе (Холодкевич и др., 2009а) впервые были обнаружены 10- и 30-минутные ультрадианные ритмы в кардиоактивности двустворчатых моллюсков.

В проведенных ранее исследованиях (Холодкевич и др., 2008а) нами было показано, что наблюдаемые в движении створок УР могут синхронно проявляться в кардиоактивности различными способами: в виде антибатных изменений ЧСС при неизменной амплитуде сердечных сокращений (АСС), в виде синбатных изменений АСС при неизменной ЧСС. Кроме того, УР могут наблюдаться в кардиоактивности без заметных изменений в движении створок, и наоборот. Движение створок в значительной степени отражает пищевое поведение, следовательно, можно предположить, что обнаруженные в настоящей работе проявления разных взаимосвязей кардиоактивности и движения створок отражают особенности пищевого поведения мидий.

Природа обнаруженных в этой работе УР пока не изучена. Представляется, однако, очевидным, что их наличие необходимо учитывать при анализе данных автоматических систем биомониторинга качества поверхностных вод, в которых в качестве тест-организмов используют двустворчатых моллюсков (Depledge et al., 1991; Kholodkevich et al., 2007). Кроме того, анализ эндогенной ритмики ЧСС мидий необходим для более корректной интерпретации результатов целого ряда исследований по влиянию природных и/или антропогенных воздействий на сердечную активность и движение створок двустворчатых моллюсков.

По мнению авторов, при достаточной изученности УР, как физиологических показателей особенностей состояния функциональных систем организма животного, УР в кардиоактивности и движении створок моллюсков могут стать новыми показателями для оценки функциональных адаптаций морских организмов к изменениям характеристик среды их обитания.

Одним из наглядных примеров проявления функциональных адаптаций моллюсков к неблагоприятным условиям среды или недостатку пищи, является переход из активного состояния (филтрация) в состояние неактивное, с переходом к анаэробному обмену при закрытых створках (рис. 5). Этот процесс перехода животного из одного состояния в другое может быть наглядно продемонстрирован на примере изменения ЧСС мидии и движения ее створок.

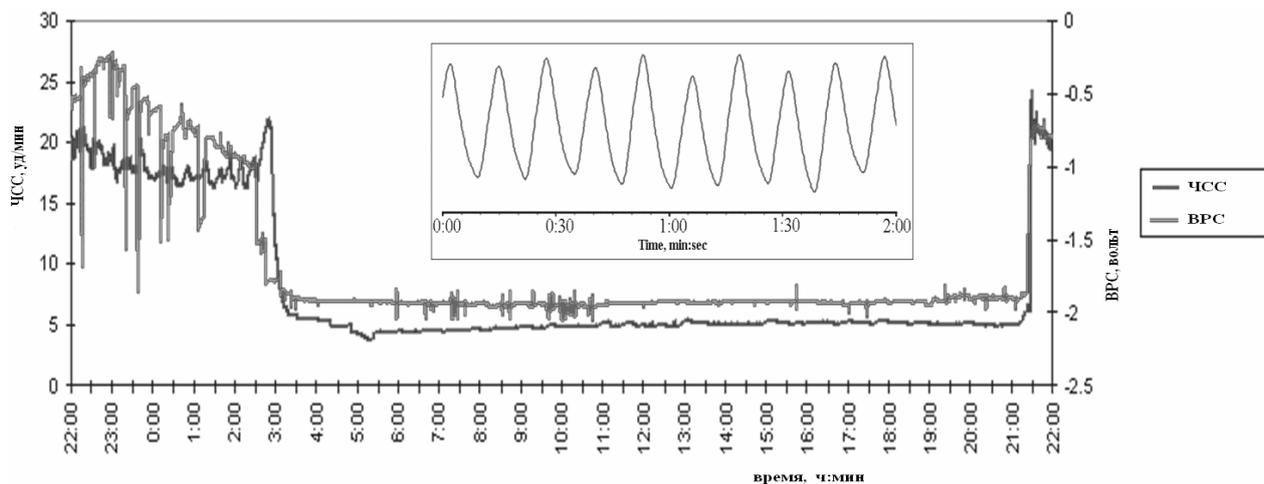


Рис. 5. Пример перехода от активного состояния к состоянию функционального покоя в течение суточной регистрации движения створок и кардиоактивности.

На вставке представлена плетизмограмма сокращений сердца в период покоя при закрытых створках

Наши системы мониторинга движения створок и кардиоактивности, используемые одновременно на одних и тех же животных, позволили получить данные о том, что даже при закрытых створках наблюдаются медленные сокращения сердца моллюска (около 3,5–5 уд/мин), а не полное отсутствие их, как сообщалось ранее некоторыми авторами (Бахмет и др., 2005).

В экспериментах по изучению влияния быстрых изменений температуры и солености были получены показатели, характеризующие адаптивные характеристики исследуемых животных на изменения природных факторов среды обитания.

Соленость является одним из ключевых факторов среды обитания водных организмов. Влияние изменения солености на морских моллюсков, как пойкилосмотических организмов, представляет особый интерес в связи с выяснением особенностей и механизмов природных адаптаций, связанных с экологическими факторами (Kinne, 1971; Скульский, 1976; Наточин, 1979; Бергер, 1984). Обычно соленость морской воды в Черном море колеблется в пределах 18–20 ‰. В экспериментах пониженную соленость создавали добавлением в аквариум пресной воды. На рис. 6 представлен пример типичной реакции мидий на опреснение. Уже в пределах 3-х мин после начала изменения солености моллюск начинал закрывать створки, а через 15 мин они были полностью закрыты. Этот процесс сопровождается начальным резким повышением ЧСС, который можно расценивать как первичный неспецифический ответ кардиосистемы на стрессорное воздействие. Максимальная ЧСС отмечалась через 22 мин после начала подачи пресной воды.

Процесс закрытия створок обычно имеет монотонный, характер: на кривых движения створок разных особей отмечалось от 2-х до 3-х ступенчатых участков постепенного снижения величины раскрытия створок до 0 мм (рис. 6). После полного закрытия створок наблюдался процесс быстрого (в течение 15–20 мин) снижения ЧСС мидии до значений 5–7 уд/мин. Считается, что такой тип ответа кардиосистемы может быть обусловлен снижением потребления кислорода в то время, когда створки мидии закрыты.

При обратной процедуре, замещении воды в аквариуме на морскую воду, процесс раскрытия створок протекал с быстрой избыточной реакцией кардиосистемы, превышением фоновых значений ЧСС в начальный период реакции. Выраженная начальная тахикардия рассматривалась как результат стрессорного воздействия, вызванного резким изменением солености воды (Холодкевич и др., 2009б). Отметим, что при таком неповреждающем воздействии – изменении солености воды (в пределах физиологической толерантности вида), реакция раскрытия створок при отмыве и начало процесса «возвращения» ЧСС к фоновым значениям совпадают по времени.

В качестве другого неповреждающего стандартного стимула использовали экстренные изменения температуры воды (Холодкевич и др., 2008а). Так, экстренное повышение температуры на 30% (с 16 до 21 °С) приводит к быстрому закрытию створок, кратковременному резкому (в течение 2–4 мин) повышению ЧСС на 70–100% с последующим медленным (в течение 20–30 мин) понижением ЧСС до 3–6 уд/мин (глубокая брадикардия). При этом обнаружено

сходство начальной фазы ответа на этот стимул у разных особей и значительные различия в дальнейшем развитии реакций. Последнее, на наш взгляд, обусловлено проявлением разной адаптивной способности отобранных мидий к данному тест-воздействию.

Следует отметить, что рассмотренные выше кратковременно действующие неповреждающие стимулы: изменение солёности и температуры не приводили к нарушению циркадианного ритма в кардиоактивности и движении створок черноморских мидий.

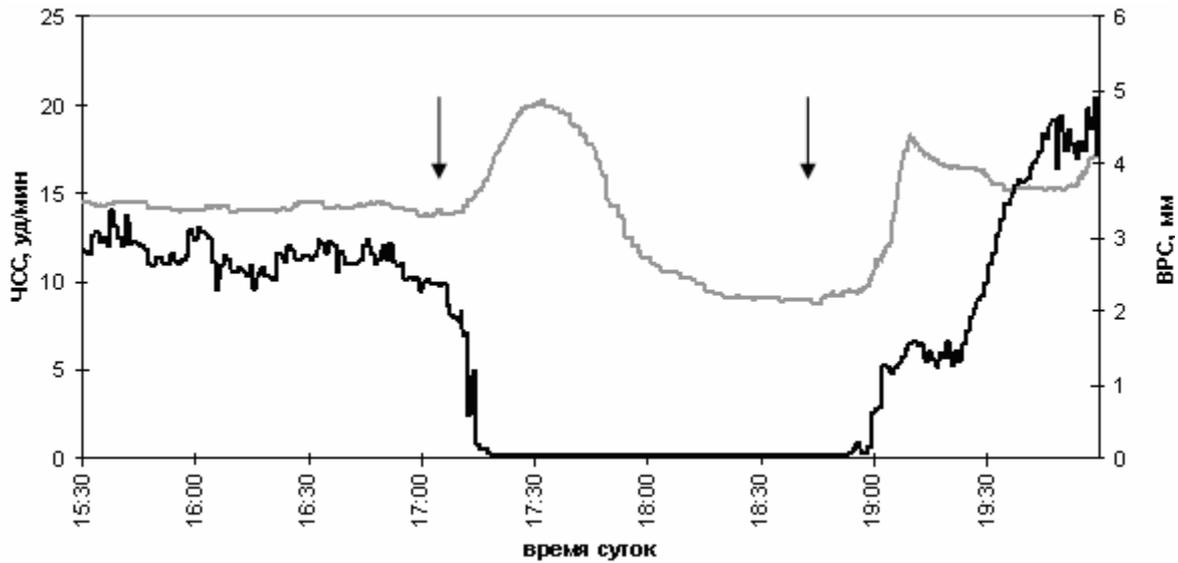


Рис. 6. Усредненные данные ЧСС (по 7 мидиям) и ВРС (по 16 мидиям) при быстром изменении солёности воды (с 18 до 12‰ и обратно). Время подачи пресной воды и обратной замены ее на морскую отмечено стрелками. Серая линия – ЧСС (уд/мин), черная линия – ВРС (мм). По оси абсцисс – реальное время регистрации (час: мин)

Более высокая информативность одновременного измерения и анализа при исследованиях кардиоактивности и движения створок отчетливо проявилась в токсикологических экспери-

ментах по воздействию высоких концентраций токсического вещества – гидрохинона (1 г/л). На рис. 7 видно быстрое закрытие створок мидий при воздействии такого раздражителя.

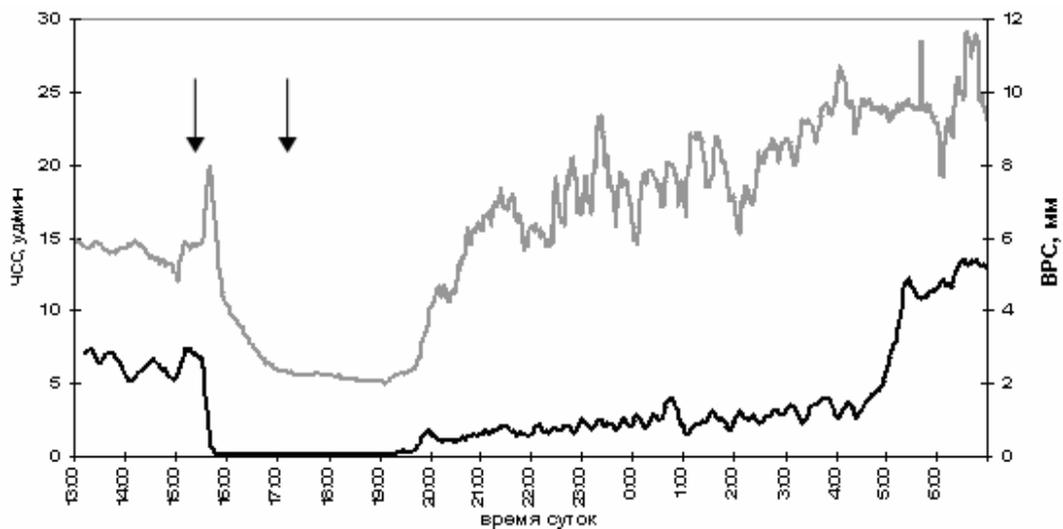


Рис. 7. Усредненные по 7 животным данные по воздействию гидрохинона в концентрации 1 г/л на ЧСС (серая кривая) и ВРС (черная кривая).

Стрелками указаны момент подачи гидрохинона и начало отмыва (вторая стрелка) морской водой от токсиканта. Остальные обозначения как на рис. 6

Как и в приведенном выше примере неповреждающего воздействия, в начальном периоде закрытия створок на токсическое воздействие наблюдается резкое повышение ЧСС, а после полного закрытия развивается брадикардия, длящаяся до 30–40 мин и выражающаяся в снижении ЧСС до 4–5 уд/мин. При таком остром воздействии начало повышения ЧСС при отмыве от токсиканта может опережать процесс активного раскрытия створок на много часов. Последнее может быть связано с десенситизацией хемочувствительных структур и частичной блокадой нервно-мышечной передачи в ответ на действие высоких доз органического токсиканта.

Проведенные нами токсикологические эксперименты показали приспособительный характер реакций моллюсков при поступлении вредных для их организма веществ (солей тяжелых металлов, аммония, детергентов, гидрохинона и др.) в среду, который выражался в быстром закрытии створок и продолжительном (достигающем иногда 9–12 часов) состоянии моллюска с закрытыми створками даже после отмывания моллюсков от токсиканта путем замещения воды на чистую морскую. Во всех проведенных токсикологических исследованиях полученная реакция кардиосистемы соответствовала классическому принципу токсикологии «доза-эффект».

Для оценки экологического состояния различных водных объектов в нашей работе применялся методический прием, основанный на перемещении моллюсков одного вида из чистых мест обитания (референтная станция) в районы, подверженные антропогенному загрязнению, и дальнейшему содержанию животных в специальных садках (кейджах) в течение некоторого выбранного исследователями периода времени (3 недели). Адаптивные возможности двустворчатых моллюсков тестировали с помощью активного метода биоиндикации, т.е. по ответам («откликам») организмов на один или более стандартных стимулов (быстрое изменение солености и/или температуры) и по оценке динамики характеристик кардиоактивности каждой отдельной особи до и после такого воздействия. Было обнаружено, что в загрязненных акваториях уровень адаптивных возможностей организмов, оцениваемый по реакциям мидий на стимулы, ослаблен по сравнению с таковым в условно чистых акваториях. Это выражалось в существенно большем времени восстановления характеристик кардиоактивности после снятия функциональной нагрузки.

Выводы

На основании проведенных исследований показано, что функциональная активность той части двигательной системы, которая обеспечивает движение створок моллюска, находится в строгой зависимости от суточных изменений интенсивности освещения. Максимумы активности наблюдаются в 19–20 ч, минимумы – в предутренние – 5–6 утра.

Выявленные изменения в функциональной активности кардиосистемы достаточно хорошо коррелируют с колебаниями температуры окружающей моллюска воды в течение суток.

Наряду с суточными ритмами активности в кардиоактивности моллюсков обнаружены ритмы ультрадианного диапазона, связанные, вероятно, с активностью сифонов моллюсков и особенностями их пищедобывательного поведения.

Несовпадение суточных сдвигов уровней активности изучаемых систем, играющих ведущую роль в функционировании организма моллюсков, в значительной мере определяется как экзогенными (температура воды, освещенность), так и эндогенными (основной обмен, двигательная активность и др.) факторами.

Как показали наши исследования (Kuznetsova et al., 2008; Холодкевич и др., 2009а), проведенные на мидиях, показатели кардиоактивности и движения створок двустворчатых моллюсков могут служить маркерами адаптивных возможностей организма в конкретной среде обитания. По мнению авторов, при достаточной изученности УР, как физиологических показателей особенностей состояния функциональных систем организма животного, УР в кардиоактивности и движении створок моллюсков могут стать новыми показателями для оценки функциональных адаптаций морских организмов к изменениям характеристик среды их обитания.

Предложенный авторами настоящей работы методический подход по оценке адаптационных возможностей животных-биоиндикаторов с помощью тест-стимулов может оказаться эффективным также при решении задач, связанных с оценкой здоровья морских экосистем, в которых эти животные обитают.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность директору Карадагского природного запо-

ведника НАН Украины А. Л. Морозовой за предоставление возможности проведения значительной части данного экспериментального исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-92424-BONUS_a.

Литература

Ашофф Ю. Биологические ритмы. 1984. М. Мир. 414 с.

Бахмет И. Н., Бергер В. Я., Халаман В. В. Сердечный ритм у мидий (*Mytilus edulis* (Bivalvia)) при изменении солёности // Биология моря. 2005. Т. 31. С. 363–366.

Бергер В. Я. Исследование адаптации некоторых литоральных беломорских моллюсков к изменениям солёности среды // Автореф. канд. биол. наук. Л. 1971. 18 с.

Наточин Ю. В., Михайлова О. Ю., Лаврова Е. А., Хлебович В. В. Содержание воды и электролитов в клетках аддуктора мидии *Mytilus edulis* в широком диапазоне солёности морской воды // Биология моря. 1979. № 4. С. 54–60.

Скульский И. А. О роли калия в адаптации морских моллюсков к пониженной солёности внешней среды // Экспериментальная экология морских беспозвоночных. Владивосток. 1976. С. 165–166.

Столбов А. Я., Трусевич В. В., Мишуков В. Ж., Шеянов В. А. Автоматизированный комплекс измерения двигательной активности моллюсков (АКИДАМС) и его применение для мониторинга состояния водной среды // Сборник научных трудов, Карадагского природного заповедника НАН Украины. Симферополь: СОНАТ. 2004. Кн. 2. С. 226–230.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Иванов А. В., Любимцев В. А., Халатов А. Н., Куракин А. С., Корниенко Е. Л., Трусевич В. В., Гнубкин В. Ф. Автоматическая система биомониторинга на основе одновременного анализа кардиоактивности и движения створок моллюсков // Нефть и газ арктического шельфа – 2008: Материалы международной конференции. Мурманск, 12–14 ноября. Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2008а. С. 312–320.

Холодкевич С. В., Иванов А. В., Кузнецова Т. В., Куракин А. С., Трусевич В. В. О возможности использования биомаркеров на основе ультрадианных ритмов кардиоактивности и движения створок моллюсков в мониторинге экологического состояния морских акваторий // Нефть и газ арктического шельфа – 2008: Материалы международной конференции. Мурманск, 12–14 ноября. Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2008б. С. 302–309.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Трусевич В. В., Куракин А. С. Особенности кардиоактивности и движения створок *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и при токсическом воздействии // Сборник научных трудов посвященных 95-летию Карадагской биологической станции и 30-летию Карадагского природного заповедника. Симферополь. 2009а. НВЦ «ЭКОСИГидрофизика». – С. 524–537.

Холодкевич С. В., Иванов А. В., Кузнецова Т. В., Куракин А. С., Корниенко Е. Л., Паньков С. Л., Халатов А. Н. Ультрадианные ритмы в кардиоактивности двустворчатых моллюсков // ДАН. 2009а. Т. 426, № 6. С. 831–833.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Трусевич В. В., Куракин А. С., Иванов А. В. Особенности движения створок и кардиоактивности двустворчатых моллюсков при действии различных стрессоров // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2009б. Т. 45, № 4. С. 432–434.

Edgar B.A., Lehner C.F. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective // Science. 1996. V. 274. P. 1646–1652.

Ding J., Buchanan G., Tischkau S., Dong Chen, Kuriashkina L., Faiman L., Alster J., McPherson P., Campbell K., Gillette M. A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock // Nature. 1998. V. 394. P. 381–384.

Kholodkevich S.V., Fedotov V.P., Ivanov A.V., Kuznetsova T.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L. Fiber-optic remote biosensor systems for permanent biological monitoring of the surface waters quality and bottom sediments in the real time // <http://www.ices.dk/products/CMdocs/cm-2007/I/I-2007.pdf>.

Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L., Fedotov V.P. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // Environmental Bioindicators. 2008. V. 3. № 1. P. 23–34.

Kinne O. Salinity-animal invertebrate // Marine ecology. 1971. V. 2. P. 821–995.

Kuznetsova T.V., Kholodkevich S.V., Kurakin A.S., Ivanov A.V., Kornienko E.L., Trusevich V.V., Gnyubkin V.F. Ecotoxicological investigations of chemical stressors effects on cardiac activity of *Mytilus galloprovincialis* Lam. // SETAC 18-th Annual Meeting, Warsaw. May 25–28. 2008. Abstract Book (pdf). P. 168–169.

Newell C.R., Wildish D.J., MacDonald B.A. The effects of velocity and seston concentration on the exhalant siphon area, valve gape and filtration rate of mussel *Mytilus edulis* // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2001. V. 262. P. 91–111.

Ortmann C., Grieshaber M. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea* // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. P. 4167–4178.

Riisgard H.U., Kittner C., Seerup D.F. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 284. P. 105–127.

Rodland D.L., Schone B.R., Helama S., Nielsen J.K., Baier S. A clockwork mollusks: Ultradian rhythms in bivalve activity revealed by digital photography // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006. V. 334. P. 316–323.

Stupfel M., Damiani P., Perramon A., Busnel M., Gourlet V., Thierry H. Ultradian and circadian respiratory rhythms in grouped small laboratory species as a method to assess the effects of environmental challenges // Comp. Biochem. Physiol. 1985. V. 80A. № 2. P. 225–231.

INVESTIGATIONS OF PHYSIOLOGICAL ADAPTATIONS IN BIVALVE MOLLUSKS BASED ON BIOMARKERS OF CARDIAC ACTIVITY AND VALVE MOVEMENTS

T.V. Kuznetsova¹, V.V. Trusevich², A.S. Kurakin¹, S.V. Kholodkevich¹, A.V. Ivanov¹

¹Scientific Research Center for Ecological Safety RAS, Sankt-Petersburg, Russia,

²Karadag Nature Reserve NAN Ukraine, Feodosia, Ukraine

e-mail: kuznetsova_tv@bk.ru

The paper presents results of the studies *in situ* and in laboratory conditions of valve movements (VM) and heart rate (HR) of *Mytilus edulis* L. and *Mytilus galloprovincialis* Lam.

Special attention was paid to reveal expression of circadian and ultradian rhythms in HR and VM and to study organism's responses to environmental challenges (temperature, salinity, detritus content in water). A new approach to study physiological adaptations was carried out in caging experiments in mussels transplanted from pure zone and kept in

cages for 3 weeks in 3 areas subjected to anthropogenic pressure. After exposure mussels were tested by standard stimuli (salinity and/or temperature changes). The responses to stimuli in these 3 mussel's groups were compared with their initial ones and among groups. It was shown that HR in recovery process after salinity or/and temperature stimuli in exposed mussels differed from their initial values. This fact can be explained by changes in their adaptive capacities and depended on habitat quality.

РОЛЬ СЕРОТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКЗОТРОФИИ У РЫБ

В. В. Кузьмина

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН, п. Борок, Ярославская обл., Россия,
e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

Введение

Регуляция экзотрофии – сложный процесс, находящийся под нейро-гуморальным контролем. Наиболее подробно исследована регуляция начального звена экзотрофии – пищевого поведения рыб (Кузьмина, 2005). Продемонстрировано участие в центральной регуляции пищевого поведения рыб различных гормонов и нейропептидов (De Pedro, Björnsson, 2001). Твердо доказано ингибирующее влияние на количество потребляемой рыбами пищи таких гормонов и пептидов, как гистамин, кортиколиберин, дофамин, серотонин, бомбезин, холецистокинин, а также стимулирующее действие галанина, нейропептида Y и β-эндорфина. Есть сведения об увеличении потребления пищи под влиянием гормона роста. Обсуждается влияние на этот процесс α-меланоцитстимулирующего и тиреотропного гормонов, глюкагона глюкагоно-подобного пептида -1, инсулиноподобного фактора-1, пептида YY, а также норадреналина, γ-аминомасляной кислоты, меланинконциртрирующего гормона, тиреоидных гормонов, инсулина и лептина (Кузьмина, 2005). Вместе с тем роль моноаминов в регуляции пищевого поведения рыб изучена недостаточно. При исследовании влияния серотонина на потребление пищи карасем *Carassius auratus* выявлен аноректический эффект только в случае его центрального (интравентрикулярного) введения. Достоверный ингибиторный эффект при внутрибрюшинном введении 5-HT не обнаружен (De Pedro et al., 1998).

Вместе с тем серотонин может влиять на пищевое поведение не только как нейротрансмиттер, но и как гормон. Это предположение базируется на том, что значительная часть серотонина синтезируется в кишечнике рыб (Holmgren, Nilsson, 1983). Особо следует отметить, что тра-

диционно во всех известных работах учитывалось только количество потребляемой пищи. Вместе с тем изучение пищевого поведения должно по возможности охватывать все этапы этого процесса, в том числе двигательную активность. Сведения о влиянии серотонина на характеристики пищеварительных ферментов, реализующих центральный этап экзотрофии – процессы пищеварения у рыб в доступной литературе отсутствуют.

Цель работы – изучения влияния периферически введенного серотонина на различные аспекты пищевого поведения и процессы пищеварения у рыб (на примере карпа).

Материал и методы

Работа проведена в течение 2009–2010 г.г. Объект исследования: карп обыкновенный *Cyprinus carpio* L. Масса тела $9,2 \pm 0,4$ г. До начала опыта рыб содержали в 200-литровых аквариумах с проточной водой. Рыб кормили ежедневно (5% от массы тела) кормом с преобладанием белковых компонентов (17,3% белка, 1,7% жира и 0,1% углеводов в расчете на сырой вес). Затем рыбы, разбитые на четыре экспериментальные группы (по 5 особей в каждой), были пересажены в непроточные аквариумы объемом 40 л (площадь дна 30 x 60 см) с принудительной аэрацией (температура воды $20 \pm 2^\circ\text{C}$). Режим освещенности – 6 ч «свет» (450 лк), 18 ч «темнота» (0,08 лк). Смену воды в аквариумах производили по мере ее загрязнения. За два дня до опыта рыб переставали кормить. Для моделирования бентосного типа питания рыб помещали в камеру из прозрачного оргстекла с перфорациями (стартовый отсек), размером 10 x 5 x 6 см, которую устанавливали у задней стенки аквариума. Передняя стенка камеры могла подниматься. У противоположной стенки аквариума помещали корм (30

экз. замороженных личинок хирономид, индивидуальная масса 7,5 мг). Когда передняя стенка камеры поднималась, рыбы могли выходить из камеры для поиска и потребления корма. Перед началом опытов рыб в течение двух недель учили находить корм в описанных выше экспериментальных условиях. Регистрировали три параметра – время нахождения рыб в стартовом отсеке после подъема передней стенки камеры (t_1), время, необходимое для достижения рыбами корма – латентное время питания (t_2), величина которого обратно пропорциональна скорости пищевой реакции, а также рацион (R). В последнем случае учитывали количество съеденных личинок хирономид за 3 мин наблюдения. Наблюдения проводили 2 раза в сутки – в 9 и 14 ч на протяжении 3-х сут. За 1 ч до опытов рыбам контрольной группы внутривентриально или внутримышечно вводили 0,1 мл раствора Рингера для холоднокровных животных (109 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 1,1 мМ CaCl₂, 1,2 мМ NaHCO₃), рыбам опытной группы – равное количество гидрохлорида серотонина, производства Sigma, в дозе 10 мкг/г массы тела, приготовленного на том же растворе Рингера. В ряде опытов за 1 ч до введения серотонина рыбам вводили папаверин в дозе 0,02 мг/г массы тела.

Общую амилолитическую активность (суммарная активность α -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) определяли при помощи метода Нельсона в модификации А. М. Уголева и Н. Н. Иезуитовой (1969). Протеолитическую активность (преимущественно активность трипсина, КФ 3.4.21.4) оценивали по увеличению концентрации тирозина по методу Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Для определения амилолитической активности в качестве субстрата использовали 1% раствор растворимого крахмала (рН 7,4), протеолитической активности – 1% раствор казеина (рН 7,4). Инкубацию гомогената и субстрата осуществляли при температуре 20°C в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Об уровне ферментативной активности судили по приросту продуктов реакции за 1 мин инкубации субстрата и ферментативно активного препарата с учетом фона (количество глюкозы и тирозина в исходном гомогенате) в расчете на 1 г сырой массы ткани (мкмоль/г·мин. Для оценки влияния серотонина на состав жидких сред у рыб из хвостовых сосудов брали пробы крови. Концентрацию глюкозы в крови (ммоль/л) определяли при помощи аппарата Accu-Chek Active.

Данные обработаны статистически с использованием приложения EXCEL программы MS Office'XP. Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюденту при $p \leq 0,05$, в ряде случаев – при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, при том же уровне значимости.

Результаты

Важно отметить, что внутривентриальное введение серотонина приводит к изменению поведения рыб: через 1,5–2 мин после инъекции рыбы, всплывающие к поверхности воды, активно поглощают воздух и держатся в этом слое около 20–30 мин. Затем они постепенно опускаются в придонные слои воды, что характерно для рыб-бентофагов. К моменту начала регистрации пищевой реакции, рыбы опытной группы не отличаются по поведению от рыб контрольной группы. Поскольку известно о том, что серотонин является агонистом (стимулятором) 5-HT₂-рецепторов, локализованных в гладкой мускулатуре стенок сосудов, можно предположить, что серотонин, сужая сосуды и негативно влияя на стенку плавательного пузыря, ухудшает дыхательную функцию. Действительно, предварительное введение папаверина, обладающего спазмолитическим действием, снимает этот эффект.

Влияние внутривентриальных инъекций серотонина на пищевое поведение рыб. Данные, касающиеся времени пребывания в стартовом отсеке (t_1) рыб контрольной группы, получавших внутривентриальные инъекции раствора Рингера, свидетельствуют о достаточной стабильности показателя в течение 24 ч и последующем его снижении к концу эксперимента. В течение периода наблюдений значения t_1 изменялись от $1,3 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,4$ сек. У рыб опытной группы наблюдалось достоверное увеличение значений t_1 через 1, 5 и 53 ч (в последнем случае на 70%) после введения серотонина (рис. 1).

Данные, касающиеся латентного времени питания (t_2), свидетельствуют о еще большей стабильности показателя у рыб контрольных групп. В течение периода наблюдений значения t_2 изменялись от $2,9 \pm 0,3$ до $3,9 \pm 0,3$ сек. У рыб опытных групп наблюдался резкий подъем показателя через 1 ч после введения серотонина (до $14,3 \pm 5,5$ сек). Достоверное увеличение значений t_2 наблюдается через 5, 29 и 53 ч после введения серотонина (максимум на 110%). В последующие сроки на фоне снижения величины t_2 было отмечено колебательное изменение этого показателя. Важно отметить достоверное превышение уровня контроля почти во все сроки наблюдения.

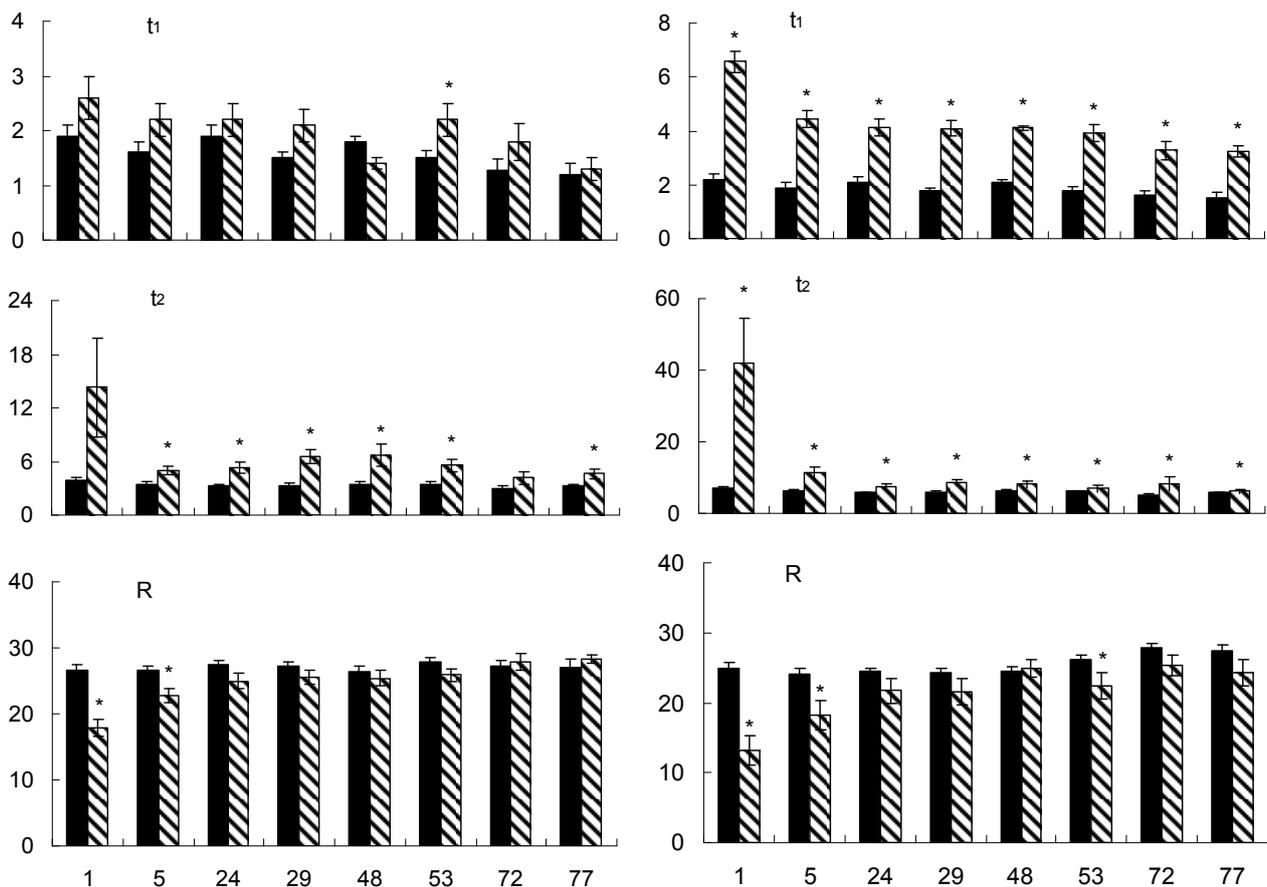


Рис. 1. Влияние периферически введенного серотонина на пищевое поведение карпа.

Обозначения: по горизонтали – время, ч, по вертикали – t1 и t2, сек, R – экз. личинок хирономид.
 Слева – внутрибрюшинное введение серотонина, справа – внутримышечное

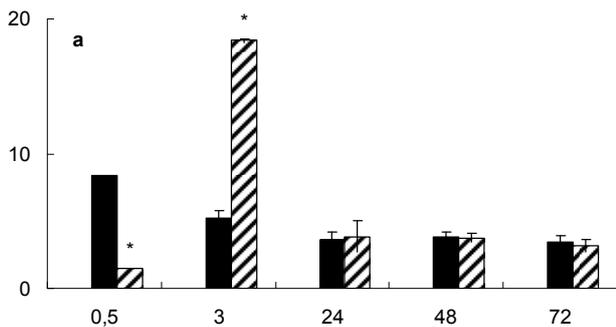
Данные, касающиеся рациона (R), также свидетельствуют о незначительной вариабельности показателя у рыб контрольных групп в течение периода наблюдений: значения изменялись от $26,4 \pm 0,8$ до $27,8 \pm 0,7$ экз. личинок хирономид. У рыб опытной группы при введении раствора Рингера наблюдалось значительное и достоверное снижение величины показателя через 1 ч после введения серотонина (до $17,9 \pm 1,3$ экз. личинок хирономид). Затем было отмечено некоторое увеличение значений R. Однако и через 5, и через 24 ч сохранялись достоверно более низкие по сравнению с контролем величины показателя: соответственно $22,8 \pm 1,1$ и $25,0 \pm 1,1$ экз. личинок хирономид. При этом максимальное снижение рациона не превышало 35%. В последующие сроки наблюдения величина R была близка таковой рыб контрольной группы.

Влияние внутримышечных инъекций серотонина на пищевое поведение рыб. При внутримышечном введении раствора Рингера время пребывания в стартовом отсеке (t1) рыб контрольной группы несколько отличалось от такового

при внутрибрюшинном введении. Значения t2 изменялись от $1,3 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,4$ сек. Однако у рыб опытной группы наблюдалось резкое достоверное увеличение значений t1 на всем протяжении эксперимента. Через 1 ч после введения серотонина величины t1 соответствовали $6,6 \pm 1,2$, в конце – $3,2 \pm 1,5$ сек. Время достижения кормового пятна (t2), у рыб контрольных групп колебалось от $2,9 \pm 0,3$ до $3,9 \pm 0,3$ сек. У рыб опытных групп наблюдался резкий достоверный подъем показателя через 1 ч после введения серотонина (до $41,9 \pm 12,6$ сек). В последующие сроки наблюдения значения t2 резко снижались, оставаясь, однако, достоверно выше уровня контроля.

Данные, касающиеся рациона (R), также свидетельствуют о незначительной вариабельности показателя в течение периода наблюдений у рыб контрольных групп: значения изменялись от $26,4 \pm 0,8$ до $27,8 \pm 0,7$ экз. личинок хирономид. У рыб опытной группы при введении серотонина наблюдалось значительное и достоверное снижение величины показателя через 1 ч после

введения (до $13,2 \pm 2,1$ экз. личинок хирономид). Несмотря на некоторое увеличение значений R, через 5 ч сохранялись достоверно более низкие по сравнению с контролем величины показателя ($18,1 \pm 2,1$ экз. личинок хирономид). В последующие сроки наблюдения величина R статистически не отличалась от таковой рыб контрольной группы, однако через 53 ч снова были выявлены достоверные различия (значения R соответствовали $22,4 \pm 1,9$ экз. личинок хирономид).



Влияние внутрибрюшинных инъекций серотонина на уровень гликемии у рыб. При введении серотонина уровень гликемии значительно изменяется (рис. 2). Так, у интактных рыб содержание глюкозы в крови соответствует $3,3 \pm 0,5$ ммоль/л. Через 0,5 ч после инъекции уровень гликемии снижается в 5,3 раза по сравнению с контролем (до 1,6 ммоль/л). Однако через 3 ч после введения серотонина уровень гликемии увеличивается в 11,5 раз (до 18,4 ммоль/л).

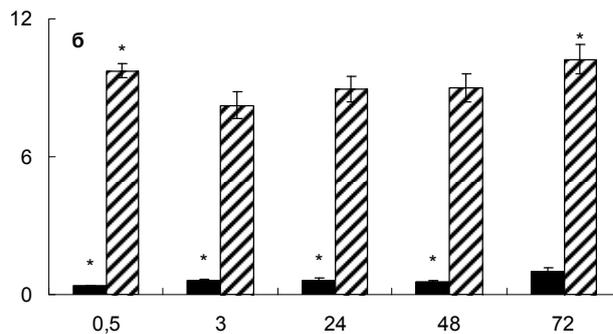


Рис. 2. Влияние внутрибрюшинно введенного серотонина на уровень гликемии (а) и активность пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника (б) карпа.

Обозначения: по горизонтали – время, ч, по вертикали на (а) темные столбики – контроль, заштрихованные – опыт, на (б) – активность протеиназ и гликозидаз соответственно

Влияние внутрибрюшинных инъекций серотонина на уровень протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника рыб. Уровень активности протеиназ и гликозидаз у интактных рыб соответствует $1,0 \pm 0,1$ и $6,8 \pm 0,8$ мкмоль/г·мин. При этом коэффициент П/Г (активность протеиназ/активность гликозидаз) соответствует 0,15, что свидетельствует о значительно большей по сравнению с белками роли углеводов в пище карпов. Активность протеиназ после введения серотонина достоверно снижается почти во все сроки наблюдения – через 0,5, 3, 24 и 48 ч. Активность гликозидаз, напротив, возрастает, достоверно – через 0,5 и 72 ч после введения серотонина.

Обсуждение результатов

При анализе полученного материала следует отметить, что данной работе впервые получены данные, свидетельствующие не только о возможности достоверного снижения под влиянием периферически введенного серотонина количества потребляемой пищи, но и о его влиянии на двигательные реакции, активность пищеварительных гидролаз и уровень гликемии. В наиболее близкой по дизайну эксперимента работе (отличие – режим освещения, равный 12:12)

достоверное снижение количества потребляемой карасями пищи наблюдалось только при интравентрикулярном введении той же дозы препарата (De Pedro et al., 1998). Отсутствие эффекта при внутрибрюшинном введении серотонина по мнению авторов свидетельствовало о его участии лишь в центральной регуляции пищевого поведения рыб. Также важно подчеркнуть, что достоверный эффект серотонина в цитируемой работе был зарегистрирован только в первый срок после инъекции (2 ч). В более поздние сроки наблюдения (2–5 и 5–8 ч) снижения количества карасями потребляемой пищи не наблюдалось. При этом снижение количества потребляемой рыбами пищи, наблюдавшееся при интравентрикулярном введении той же дозы серотонина объяснялось посредничеством кортикотропин-релизинг-фактора (CRF), который осуществляет не только собственные аноректические эффекты, но и может участвовать в качестве медиатора в эффектах серотонина, активируя CRF-нейроны, ингибирующие в свою очередь серотонинергическую трансмиссию. При этом отсутствие эффекта при внутрибрюшинном введении серотонина объяснялось крайне слабым его проникновением через гематоэнцефалический барьер (De Pedro et al., 1998).

Однако в последние годы была доказана как возможность проникновения молекул серотонина из пищеварительного тракта в кровь, так и возможность преодоления ими гематоэнцефалического барьера (Rubio, 2006).

Не исключено, что в наших опытах, проводимых в условиях более слабой освещенности (450 и 0,08 лк, режим 5:18 ч) по сравнению с условиями эксперимента, проводимого на серебряном карасе (12:12 ч) (De Pedro et al., 1998), уровень собственного серотонина у всех исследованных групп рыб был понижен. Известно, что нормальная зона освещенности для роста карпа – 430–2200 лк (Ручин, 2001), а в природном водоеме на глубине 1 м освещенность колеблется от 6000 лк в ясный день до 3200 лк – в пасмурный (Кузнецов, Ручин, (2001). Возможно, в результате более слабой освещенности эндогенный серотонин не создавал конкуренцию экзогенному препарату, который мог, преодолевая гематоэнцефалический барьер, поступать в мозг и оказывать центральное влияние на пищевое поведение рыб. Косвенно об этом свидетельствует значительная вариабельность полученных нами результатов.

Однако для понимания механизма действия периферически введенного серотонина наиболее важными представляются сведения о том, что при введении препарата *per os* его уровень в плазме крови морского окуня *Dicentrarchus labrax* увеличивается от 3,5 нг/мл до 6,2 нг/мл, причем максимальный эффект достигается через 20 мин (Rubio, 2006). Следовательно, серотонин может преодолевать стенку пищеварительного тракта и с током крови попадать в другие органы. Эти факты дают основания полагать, что в регуляции потребления пищи у рыб участвуют как центральные, так и периферические механизмы. Это предположение подтверждается сведениями о том, что у млекопитающих серотонин действует как периферический посредник сытости. При этом в реализацию ингибиторного действия серотонина включены рецепторы двух типов – 5-HT_{1B} 5-HT_{2C} (Simansky, 1996). Более того, как указывалось во введении, в состав кишечного эпителия входят энтерохромаффинные клетки, вырабатывающие серотонин (Holmgren, Nilsson, 1983). Этот факт делает понятным то обстоятельство, что серотонин стимулирует секрецию ферментов поджелудочной железы, воздействует на моторику желудочно-кишечного тракта, а также, по-видимому, индуцирует эффекты гормонов. Возможность вовлечения инсулина в эффекты серотонина подтверждается двумя об-

стоятельствами. При введении рыбам инсулина не только выявлено дозозависимое снижение потребления пищи, но и отмечено значительное изменение уровня гликемии. Так, через 30 мин после введения серотонина уровень гликемии снижается в 5,3 раза по сравнению с контролем, что обычно наблюдается при введении инсулина. О вовлечении других гормонов в регуляцию гликемии свидетельствует колебательный характер ее изменения. Действительно, уже через 3 ч после введения серотонина уровень гликемии увеличивается в 11,5 раз. Этот факт может свидетельствовать об увеличении инкреции адреналина и кортизола, ингибирующее влияние которых на пищевое поведение рыб хорошо документировано. Вовлечение адреналина подтверждается наблюдающейся при этом дефекацией, обусловленной усилением моторики желудочно-кишечного тракта рыб. Также не исключено влияние серотонина на эффекты глюкагона, холецистокинина и мелатонина. На вовлечение гормонов указывает и тот факт, что в наших опытах наблюдалось колебательное пролонгированное влияние серотонина как на рацион рыб, так и на их двигательную активность. Помимо этого, опосредованное влияние на эффекты серотонина оказывает физиолого-биохимический статус рыб. В частности, в условиях голодания или недостаточного питания эффекты серотонина могут усиливаться.

Таким образом, на примере карпа впервые показано, что серотонин, введенный периферически (внутрибрюшинно или внутримышечно), пролонгированно влияет на различные аспекты пищевого поведения рыб: снижает уровень адаптивного любопытства, замедляет скорость пищевой реакции, а также уменьшает рацион рыб. Имеющиеся данные свидетельствуют о возможности не только прямого, но и опосредованного влияния периферически введенного серотонина не только на пищевое поведение рыб, но и на активность пищеварительных гидролаз, а также обмен веществ. Полученные данные расширяют сведения о действии серотонина на различные характеристики пищевого поведения и пищеварения, существенно дополняя представления о роли этого моноамина в регуляции экзотрофии у рыб.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 09-04-00075) Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. А. Б. Ручину за консультативную, а П. В. Русановой – за техническую помощь.

Литература

- Гарина Д. В. Влияние глюкозы и некоторых гормонов на пищевое поведение рыб (на примере карася и карпа). Автореф. дис...канд. биол. наук. Борок, ИБВВ РАН. 2005. 20 с.
- Ручин А. Б. Особенности роста и энергетики карпа (*Surginus carpio*) при различной освещенности // Зоол. журн. 2001. Т. 80. № 4. С. 433–437.
- Кузнецов В. А., Ручин А. Б. Влияние колебаний рН и освещенности на рост и развитие озерной лягушки *Rana ridibunda* // Зоол. журн. 2001. Т. 80. Вып. 10. С. 1246–1251.
- Кузьмина В. В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. 2005. М.: Наука, 300 с.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. 1969. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л. Наука. С. 169–173.
- Anson M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. V. 22. P. 79–83.
- de Pedro N., Bjornsson B.T. Regulation of food intake by neuro-peptides and hormones // Food intake in fish. Ch. 12. Eds. Houlihan D., Boujard T., Jobling M. Blackwell Sci. 2001. P. 269–296.
- de Pedro N., Pinillos M.L., Valenciano A.I., Alonso-Bedate M., Delgado M.J. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: Involvement of CRF // Peptides. 1998. V. 19. № 3. P. 505–511.
- Holmgren S., Nilsson S. Bbombesin-, gastrin/CCK-5-hydroxytryptamine-, neurotensin-, somatostatin-, and VIP-like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in the gut of elasmobranch, *Squalus acanthias* // Cell Tissue Res. 1983. V. 234. P. 595–618.
- Rubio V.C., Sanchez-Vazquez F.J., Madrid J.A. Oral serotonin administration affects the quantity and the quality of macronutrients selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. // Physiol. Behavior. 2006. V. 87. P. 7–15.
- Simansky K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety // Behav. Brain Res. 1996. V. 73. P. 37–42.

THE ROLE OF SEROTONIN IN FISH EXOTROPHY REGULATION

V.V. Kuz'mina

I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters RAS, Borok, Russia
e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

At the first time it was shown that serotonin injected peripherally, influence on various parameters of fish exotrophy. It decreases the level

of adaptive curiosity, the rate of feeding reaction and the ration as well as it changes the activity of some digestive enzymes.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЧЕРНОМОРСКОГО МЕРЛАНГА В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ г. СЕВАСТОПОЛЯ

Н. С. Кузьмина¹, Е. Н. Скуратовская¹, И. И. Дорохова¹, А. В. Завьялов¹, А. В. Бердиева²

¹ Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, Украина,
e-mail: kunast@rambler.ru

² Малая Академия Наук, 99011, г. Севастополь, Украина

Введение

В связи с тем, что изучение состояния популяций рыб является необходимым для целей ихтиомониторинга, а также слабой изученностью некоторых немассовых черноморских видов рыб в современный период, оценка их качественных и количественных характеристик является важной.

В этом аспекте, исследование популяционных параметров рыб является информативным для характеристики тенденций изменений как состояния животных, так и условий обитания.

Объектом наших исследований явился черноморский мерланг (пикша). Это представитель тресковых рыб, холодолюбивый вид, имеющий вторичнопромысловое значение, а также играющий важную роль в питании хищных видов рыб и дельфинов (Пробатов, Уральская, 1957; Световидов, 1964).

Улов мерланга в разные годы (и сезоны) колеблется, что связано с тем, что он не образует скоплений и совершает сезонные миграции. Так, по данным севастопольской инспекции по охране и воспроизводству рыбных ресурсов улов мерланга в юго-западном районе акватории г. Севастополя составлял в 2002 году – 36,72 т, в 2003 году – 13,5 т, в 2004 – 14,57 т, в 2005 – 3,5 т, в 2006 – 12,3 т, 2007 – 16,6 т, 2009 – 7,62 т. Размер уловов пикши из донных ловушек Института биологии южных морей в эти годы был таковым: в 2002 – 1,2 кг, в 2003 и 2004 – по 4,7 кг, в 2005 – 1,5 кг, в 2006 – 0,9 кг, в 2007 – 3,1 кг, в 2008 и 2009 – по 1 кг.

Литературные сведения о различных биологических аспектах жизнедеятельности мерланга: размножении (Дехник, 1973; Vallisneri et al., 2006), питании (Аронов, 1959; Gordon, 1977; Nagabhushanam, 1964), паразитарной инвазии (Ismen, Bingel, 1999; Potter, 1988) и др. немногочисленны и заканчиваются в большинстве случа-

ев практически серединой прошлого века (Бурдак, 1960; Гусар и др., 1982; Пробатов, Уральская, 1957). Последние сведения о биологии черноморского мерланга были описаны Овен Л. С., Шевченко Н. Ф. и Володиным С. В. в 1995 году (Володин С. В., 1995; Овен и др., 1995).

В связи с этим представлялось интересным изучить современное состояние этого вида рыб.

Цель работы: получить новые данные о современном состоянии мерланга *Merlangius merlangus euxinus*. В соответствии с этой целью были поставлены задачи:

1. Определить размерно-массовые характеристики черноморского мерланга в разные периоды с 2002 по 2009 гг.
2. Сравнить размер, массу, а также морфофизиологические параметры мерланга, отловленного в разных бухтах.

Материалы и методы

Объект исследования – мерланг *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann), отловленный с 2002 по 2009 гг. донными ловушками, установленными в бухтах г. Севастополя: б. Казачья, б. Стрелецкая, б. Карантинная. Согласно литературным данным о загрязнении воды, грунтов и рыб из указанных акваторий считаем, что по уровню антропогенного воздействия бухты располагаются следующим образом (в порядке увеличения степени загрязнения): б. Казачья < б. Карантинная < б. Стрелецкая (Скуратовская, 2009; Миронов и др., 2003).

Был проведен биологический анализ 1107 рыб, из них – 764 – самки, 194 – самцы. В ходе работы определяли следующие параметры: размер (общая длина, стандартная длина SL), масса рыбы и масса рыбы без внутренностей (масса тушки Рт), масса печени (Рп), гонад (Рг), селезенки (Рс), пол, ста-

дию зрелости. Возраст рыб определяли по отоли-там. Индекс печени (ИП), индекс селезенки (ИС), гонадосоматический индекс (ГСИ) и упитанность рассчитывали следующим образом:

$$\text{ИП} = P_{\text{п}} * 1000 / P_{\text{т}} (\%)$$

$$\text{ИС} = P_{\text{с}} * 100 / P_{\text{т}} (\%)$$

$$\text{ГСИ} = P_{\text{г}} * 100 / P_{\text{т}} (\%)$$

$$\text{Упит.} = P_{\text{т}} * 100 / (SL^3) (\%)$$

В связи с тем, что количество мерланга в разные годы было неодинаковым и небольшим, массивы данных с биологическими характеристиками рыб были объединены за несколько лет.

Результаты обрабатывали статистически по Г. Ф. Лакину. При сравнении величин морфофизиологических параметров мерланга, отловленного в разных бухтах, использовали критерий Стьюдента (Лакин, 1973).

Результаты и обсуждение

В исследованный период наблюдали значительное преобладание самок над самцами (табл. 1, рис. 1), на что прежде указывали другие

исследователи (Бурдак, 1960; Володин, 1995; Пробатов, Уральская, 1957). Такое соотношение полов присуще этому виду, обитающему в различных районах Черного моря (Бурдак, 1960; Овен и др., 1995; Пробатов, Уральская, 1957).

Мерланг в уловах представлен особями от 0+ до 5 лет, основную группу составляют двухлетки и двухгодовики, на втором месте – годовики, на третьем – трехгодовалые рыбы, а старые особи были в единичных количествах (табл. 1). Ранее было установлено, что в северо-западном районе Черного моря и южного берега Крыма преобладали рыбы 0+–1+ лет (Володин, 1995).

Таблица 1. Количество самок и самцов черноморского мерланга в 2002–2008 гг. (шт.)

Возраст, годы	2002–2003 гг.		2004–2005 гг.		2007–2008 гг.	
	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы
0+ – 1	23	15	44	11	15	10
1+ – 2	144	41	121	23	19	6
2+ – 3	39	4	29	0	17	0
3+ – 4	1	0	5	0	6	1
4+ – 5	1	0	1	1	1	0

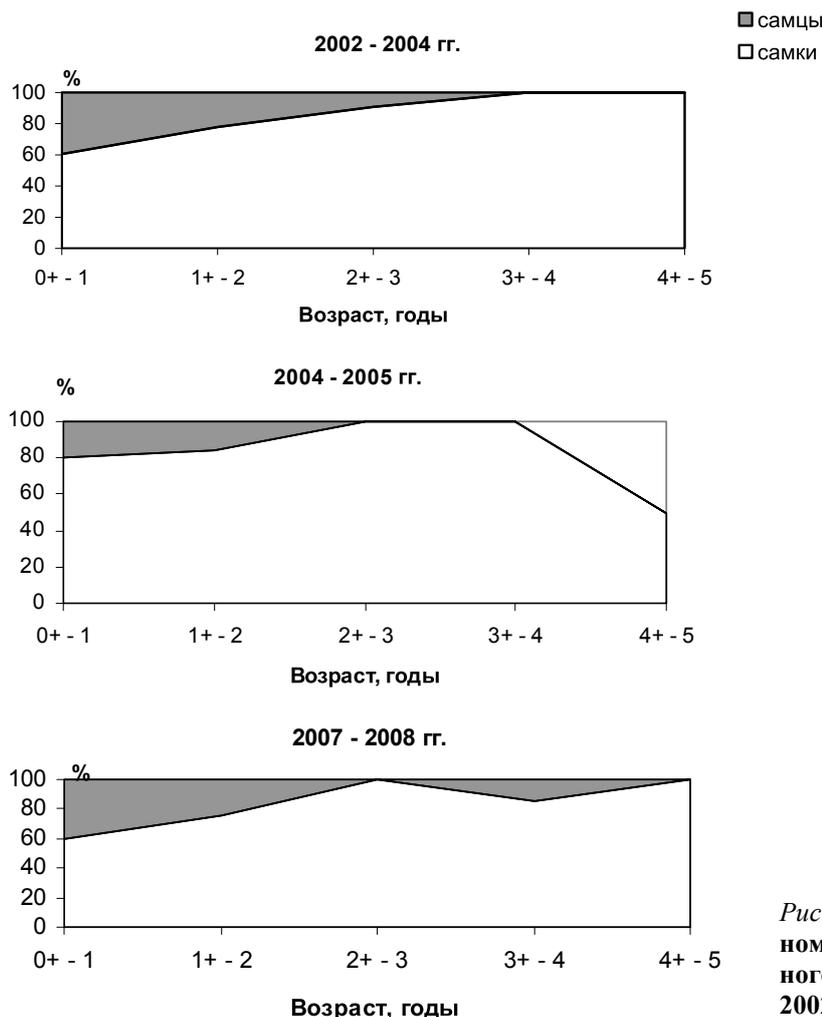


Рис. 1. Количество самок и самцов черноморского мерланга (в %), отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг.

Как и в районах Новороссийской и Балаклавской бухт в 1953–1955 гг. среди самцов во все периоды доминируют 1 и 2 годовики, а среди самок – 1–3 годовые экземпляры. Соответствующее распределение рыб разного пола отмечено и по размерам (Пробатов, Уральская, 1957).

В ходе работы было отмечено, что у самок и самцов в возрасте 0+ – 1 и 1+ – 2 года в течение 2002–2005 гг. размер был близким, а с трехлетнего возраста у самок изменялся неоднозначно (рис. 2), хотя эти отклонения могут быть связаны с малой выборкой рыб старшего возраста. Аналогичная картина и по показателю массы особей (рис. 3).

При сравнении современных данных величин размера мерланга с таковыми в период 1948–1955 гг. (Бурдак, 1960), а также 1987–1991 гг. (Володин, 1995) (в оба эти периода размерно-массовые характеристики были близки)

следует подчеркнуть, что в последнее десятилетие мерланг стал крупнее. Положительный «перелом», по-видимому, произошел после середины 90-х годов, так как еще с 1987 по 1991 гг. из-за низкой обеспеченности рыб кормом, среднепопуляционные значения длины и массы пикши снижались (Овен и др., 1995).

Сходные результаты исследований получены и для зеленушки – в последние годы темп роста *Crenilabrus tinca* увеличился, что, по мнению авторов, связано с улучшением кормовой базы (Овен и др., 2010). Не исключено, что данный факт повлиял и на увеличение размерно-массовых характеристик мерланга, по крайней мере, за счет известного (Овен и др., 2010) возрастания количественного и качественного состава ракообразных и полихет, составляющих основу рациона пикши среднего размерного класса (Бурдак, 1960).

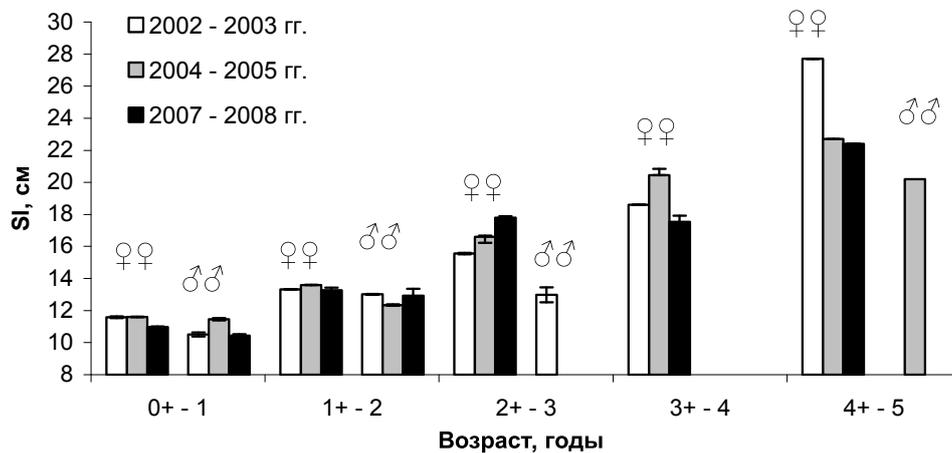


Рис. 2. Длина (SI, см) черноморского мерланга, отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг.

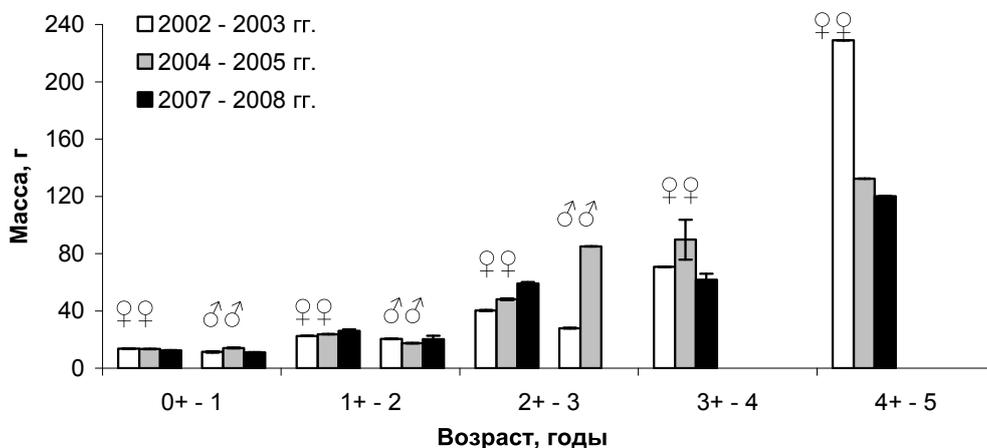


Рис. 3. Масса (г) черноморского мерланга, отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг.

Это косвенно могут подтвердить данные по ИП, величина которого у самок и самцов, а также упитанности у самок в возрасте от 1 до 3 лет достоверно увеличилась с 2004 по 2008 гг. (рис. 4, 6).

В то же время в период массового нереста ГСИ самок и самцов продолжал снижаться

(рис. 5), что свидетельствует, вероятно, о том, что репродуктивная система мерланга оказалась уязвимой по отношению к хроническому антропогенному прессу, выражающемуся в загрязнении черноморских акваторий и перелове.

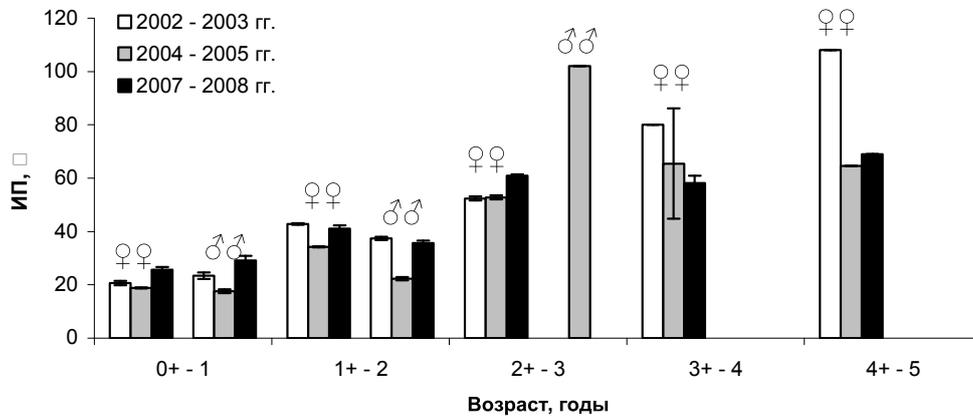


Рис. 4. Индекс печени (%) черноморского мерланга, отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг. в период нереста

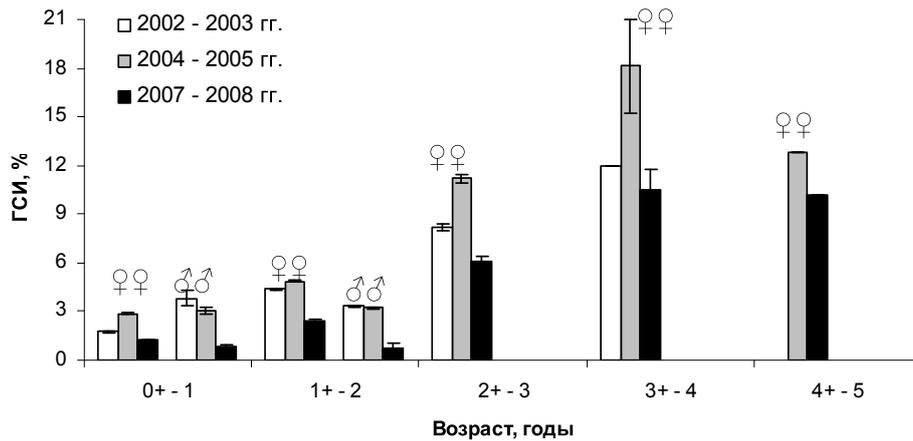


Рис. 5. Гонадосоматический индекс (%) черноморского мерланга, отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг. в период нереста

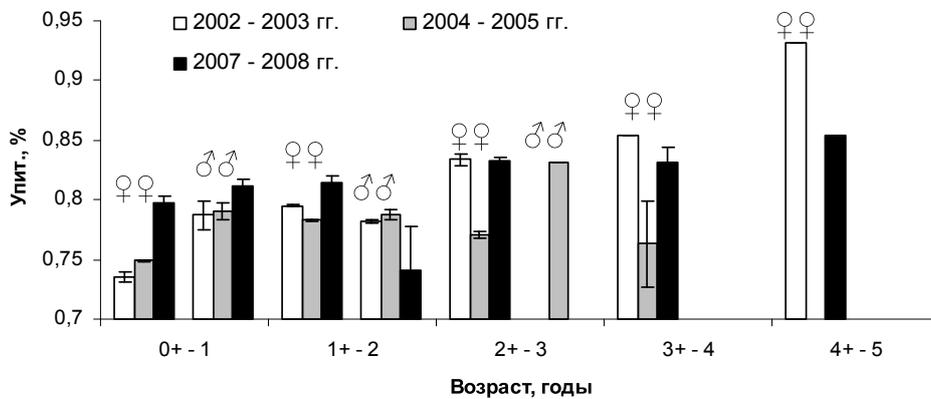


Рис. 6. Упитанность (%) черноморского мерланга, отловленного в г. Севастополе (б. Карантинная) с 2002 по 2008 гг. в период нереста

Интересно, что для морского ерша отмечена такая же тенденция: на фоне повышения размерно-массовых характеристик и упитанности, ГСИ рыб в нерестовый период продолжал снижаться (Кузьминова и др., 2009). Имеются сведения, что уже с последних лет XX века состояние репродуктивной системы черноморских рыб начало улучшаться по сравнению с периодом 1989–1991 гг. (Овен, 2004), когда наблюдали различные аномалии оогенеза, особенно у представителей придонной и донной ихтиофауны. На наш взгляд, в ближайшем будущем, у пелагических рыб, коим, по некоторым мнениям, является мерланг, следует ожидать улучшение всех популяционных характеристик.

Интересным оказался тот факт, что размерно-массовые характеристики значительно отличаются у рыб доминирующих возрастных групп из разных бухт (табл. 2). Кроме того, что бухты Казачья и Карантинная являются более чистыми, орудия лова в них установлены практически в открытой зоне моря, в то время как бухта Стрелецкая считается

высокозагрязненной и донная ловушка находится ближе к береговой зоне. Однако эти отличия не могли стать первой причиной столь сильных различий в размере и массе мерланга, подходящего к берегу в зимнее время на непродолжительное время. В Черном море мерланг распространен повсеместно – у северо-западных, северных и восточных берегов, а также у берегов Румынии, Болгарии и вдоль всего анатолийского побережья (Бурдак, 1960). В зимний период мерланг совершает миграции к побережью Крыма из различных участков Черного моря, при этом сезонные передвижения охватывают не всю популяцию, а какую-то ее часть (Бурдак, 1960). В прибрежной зоне г. Севастополя хамса, ставрида, шпрот, являющиеся объектами питания пикши, не образуют значительных скоплений, особенно в зимний период, как и мерланг, которому свойственны только локальные концентрации (Бурдак, 1960; Гусар и др., 1982). Передвигаясь к зоне ЮБК, где массово зимует хамса, мерланг также не придерживается определенных районов.

Таблица 2. Длина (SI, см) и масса (г) черноморского мерланга, отловленного в разных бухтах г. Севастополя в 2008–2009 гг.

Возраст, годы	Самки			Самцы		
	Б. Казачья N=74	Б. Карантинная N=92	Б. Стрелецкая N=99	Б. Казачья N=27	Б. Карантинная N=24	Б. Стрелецкая N=28
0+ – 1	$\frac{10,4}{9,84}$	$\frac{10,98 \pm 0,15}{12,32 \pm 0,68}$	$\frac{11,51 \pm 0,07}{14,91 \pm 0,38}$	–	$\frac{10,50 \pm 0,26}{11,10 \pm 0,89}$	$\frac{11,38 \pm 0,18}{13,29 \pm 0,38}$
1+ – 2	$\frac{14,99 \pm 0,40}{30,84 \pm 2,66}$	$\frac{12,61 \pm 0,48}{20,97 \pm 2,23}$	$\frac{12,25 \pm 0,03}{19,18 \pm 0,18}$	$\frac{14,40 \pm 0,44}{27,21 \pm 2,45}$	$\frac{12,0 \pm 0,80}{16,70 \pm 3,90}$	$\frac{11,36 \pm 0,07}{13,87 \pm 0,32}$
2+ – 3	$\frac{18,04 \pm 0,41}{54,15 \pm 4,00}$	$\frac{15,41 \pm 0,50}{41,35 \pm 3,90}$	$\frac{12,30 \pm 0,05}{19,07 \pm 0,28}$	$\frac{14,44 \pm 0,47}{27,45 \pm 2,41}$	$\frac{12,90 \pm 0,48}{21,20 \pm 1,86}$	$\frac{11,47 \pm 0,05}{14,10 \pm 0,28}$
3+ – 4	$\frac{18,47 \pm 0,78}{73,31 \pm 21,69}$	$\frac{16,04 \pm 0,98}{48,67 \pm 8,75}$	$\frac{12,77 \pm 0,19}{17,80 \pm 1,10}$	$\frac{14,00 \pm 0,90}{24,53 \pm 5,02}$	$\frac{11,0}{31,82}$	–
4+ – 5	$\frac{34,15 \pm 1,45}{407,50 \pm 112,5}$	$\frac{22,4}{120,16}$	–	–	–	–
5+ – 6	–	–	$\frac{21,93 \pm 0,57}{114,70 \pm 10,60}$	–	–	–

Примечание: числитель – длина рыб, знаменатель – масса рыб.

Все это наводит на мысль, что такие отличия связаны с тем, что в прибрежную зону г. Севастополя зимой подходит пикша из разных группировок (популяций), и, соответственно, из различных районов Черного моря (да и не в одинаковое время). Акватории, из которых мигрирует мерланг, могут отличаться своими экологическими условиями, в первую очередь кормовой базой, что и вызывает отличия в биологических параметрах мерланга (Овен и др., 1995).

Это доказывает дальнейший анализ морфофизиологических показателей рыб. Величины ИП самок мерланга из б. Казачья были выше, чем у рыб из остальных бухт, а у самок из б. Карантинная и Стрелецкая близки (табл. 3). У самцов в возрасте от 1+ до 3 лет значения ИП рыб из разных

бухт отличались слабо. При сравнении рыб одного пола и возраста было установлено, что ИП практически не отличался у рыб, отловленных в разных акваториях. У самок (возраст 1–4 года) величины ИП находились в пределах от $0,08 \pm 0,02$ до $0,12 \pm 0,04\%$, у проанализированных самцов (1–4 года) – от $0,07 \pm 0,03$ до $0,29 \pm 0,20\%$.

У самок значение ГСИ было максимальным у особей из б. Казачья, а минимальным – у рыб, отловленных в б. Карантинная. Сходные результаты получены и для самцов, хотя эти отличия выражены в меньшей степени (табл. 3). Величины упитанности слабо отличаются как у самок, так и у самцов из исследованных акваторий, однако у пикши из б. Карантинная этот параметр выше (табл. 3).

Таблица 3. Морфофизиологические параметры черноморского мерланга, отловленного в разных бухтах г. Севастополя в 2008–2009 гг.

Возраст, годы	Параметр	Самки / самцы		
		Б. Казачья	Б. Карантинная	Б. Стрелецкая
0+ – 1	ИП, ‰	<u>52,04</u> –	<u>25,67±16,37</u> 28,66±4,85	<u>46,99±1,54</u> 49,80±4,65
	ГСИ, ‰	<u>1,91</u> –	<u>1,30±0,15</u> 1,04±0,40	<u>4,47±0,39</u> 4,56±0,21
	Упит., ‰	<u>0,76</u> –	<u>0,79±0,02</u> 0,81±0,02	<u>0,79±0,01</u> 0,73±0,02
1+ – 2	ИП, ‰	<u>53,46±3,39</u> 33,72±4,03	<u>38,31±3,87</u> 34,02±3,14	<u>48,90±0,40</u> 33,85±0,85
	ГСИ, ‰	<u>12,85±1,71</u> 3,44±0,34	<u>1,98±0,27</u> 2,47±0,47	<u>5,81±0,08</u> 3,88±0,08
	Упит., ‰	<u>0,70±0,05</u> 0,76±0,02	<u>0,81±0,02</u> 0,76±0,06	<u>0,78±0,001</u> 0,76±0,004
2+ – 3	ИП, ‰	<u>67,89±6,97</u> 30,96±2,72	<u>51,86±2,52</u> 37,64±2,79	<u>46,81±0,52</u> 38,02±4,94
	ГСИ, ‰	<u>15,68±1,59</u> 4,77±0,54	<u>5,40±0,93</u> 2,42±0,34	<u>7,04±0,17</u> 3,14±0,82
	Упит., ‰	<u>0,72±0,03</u> 0,75±0,02	<u>0,83±0,01</u> 0,80±0,02	<u>0,76±0,002</u> 0,77±0,01
3+ – 4	ИП, ‰	<u>78,91±12,11</u> 48,73±21,51	<u>54,03±6,14</u> 31,82	<u>49,01±10,46</u> –
	ГСИ, ‰	<u>14,35±0,95</u> 6,54±3,15	<u>6,81±2,02</u> 0,38	<u>7,40±2,95</u> –
	Упит., ‰	<u>0,71±0,09</u> 0,54±0,23	<u>0,81±0,03</u> 0,99	<u>0,69±0,03</u> –
4+ – 5	ИП, ‰	<u>129,88±57,68</u> –	<u>68,98</u> –	<u>77,96±7,33</u> –
	ГСИ, ‰	<u>6,45±1,35</u> –	<u>10,19</u> –	<u>20,99±1,84</u> –
	Упит., ‰	<u>0,78±0,08</u> –	<u>0,85</u> –	<u>0,75±0,02</u> –

Следует учитывать и тот факт, что мерлангу свойственен эффект хоминга (homing), в силу которого взрослые половозрелые особи, уже ведущие придонный образ жизни, возвращаются на свои нерестилища, где и закладывается популяционная структура вида (Володин, 1995). Следовательно, не исключено, что отличия в экологическом состоянии бухт, где были отловлены рыбы могут быть одной из второстепенных причин различий в размере, массе и морфофизиологических параметрах рыб.

На основании вышеизложенного, можно сделать такие выводы:

– с 2002 по 2009 гг. мерланг в уловах был представлен особями от 0+ до 5 лет. Доминировали двухлетки и двухгодовики;

– сохраняется значительное преобладание самок над самцами;

– размерно-массовые характеристики одновозрастных особей в течение 2002–2008 гг. были близкими, однако превышали таковые параметры рыб в 1948–1991 гг. (Бурдак, 1960; Володин, 1995);

– наблюдали тенденцию увеличения индекса печени и упитанности *M. merlangus euxinus* в последние годы и продолжающееся снижение величин ГСИ;

– отличия в длине, массе и морфофизиологических параметрах одновозрастных рыб, отловленных в разных бухтах, могут быть связаны со сложной популяционной структурой мерланга, разными условиями обитания в периоды нагула и нереста.

Литература

Аронов М. П. Роль органов чувств в отыскании пищи у черноморского мерланга // Тр. Севастопол. биол. станции. – 1959. – Т. XI. – С. 229–237.

Бурдак В. Д. Биология черноморского мерланга *Odontogadus merlangus euxinus* (Nordmann): Дис. ...канд. биол. наук. – Севастополь, 1960. – 171 с.

Володин С. В. Популяционная структура и некоторые особенности биологии черноморского мерланга *Merlangius merlangus euxinus* Nordmann (Teleostei: Gadidae): Автореф... канд. биол. наук: 03.00.18. – Севастополь, 1995. – 24 с.

Гусар А. Г., Гетманцев В. А., Семенов А. Г. К экологии черноморского мерланга // Вопр. ихтиол. – 1982. – Т. 22. – Вып. 4. – С. 687–690.

Дехник Т. В. Размножение и ранний онтогенез черноморских тресковых – Gadidae // Биол. моря. 1973. – Вып. 29. – С. 3–22.

Кузьминова Н. С., Руднева И. И., Салехова Л. П., Овен Л. С., Шевченко Н. Ф. Состояние популяции морского ерша, обитавшего в прибрежной зоне г. Севастополя в 1998–2008 гг. // Понт Эвксинский: тезисы VI междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2009» (21–24 сент. 2009 г.) – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. – С. 63–64.

Миронов О. Г., Кирюхина Л. Н., Алемов С. В. Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. – 185 с.

Лакин Г. Ф. Биометрия. – М: Высш. школа, 1973. – 343 с.

Овен Л. С. Специфика развития половых клеток морских рыб в период размножения как показатель типа нереста и реакции на условия среды обитания. – М.: Изд-во ВНИРО, 2004. – 188 с.

Овен Л. С., Салехова Л. П., Володин С. В. Размерно-возрастной состав и спектр питания мерланга *Merlangius merlangus euxinus* (Gadidae) в разных районах Черного моря, различающихся по степени антропогенного загрязнения // Вопр. ихтиол. 1995. – Т. 35. – № 5. – С. 659–664.

Овен Л. С., Салехова Л. П., Кузьминова Н. С. Новые сведения о размерно-массовом составе рулены *Crenilabrus tinca* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Labridae) в прибрежной зоне Севастополя (Черное море) // Рыб. госп-во України. – 2010. – № 2 (67). – С. 16–19.

Пробатов А. Н., Уральская И. В. Материалы по биологии черноморского мерланга *Odontogadus merlangus euxinus* Nordmann // Тр. Новороссийской биол. станции им. В. М. Арнольди. – 1957. – Т. LVII. – С. 99–115.

Световидов А. И. Рыбы Черного моря. – Л.: Наука, 1964. – 550 с.

Скураговская Е. Н. Состояние антиоксидантной ферментной системы крови черноморских рыб в условиях комплексного хронического загрязнения: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Одесса, 2009. – 148 с.

Gordon J.D.M. The fish populations in inshore waters of the west coast of Scotland. The food and feeding of the whiting (*Merlangius merlangus* L.) // J. Fish. Biol. – 1977. – 11. – P. 513–529.

Ismen A., Bingel F. Nematode infection in the whiting *Merlangius merlangus euxinus* off Turkish Coast of the Black Sea // Fisheries Research. – 1999. – 42. – P. 183–189.

Nagabhushanam A.K. On the biology of the whiting, *Gadus merlangus*, in manx waters // J.mar.biol.Ass. U.K. – 1964. – 44. – P. 177–202.

Potter I.C. Age composition, growth, movements, meristics and parasites of the whiting, *Merlangius merlangus*, in the severn estuary and Bristol channel // J.mar.biol.Ass. U.K. – 1988. – 68. – P. 295–313.

Vallisneri M., Scapolatempo M., Tommasini S. Reproductive biology of *Merlangius merlangus* L. (Osteichthyes, Gadidae) in the northern Adriatic Sea // ACTA ADRIAT. – 2006. – 47 (2). – P. 159–165.

THE MODERN STATE OF BLACK SEA WHITHIG IN COASTAL AREA OF SEVASTOPOL

N.S. Kuz'minova¹, E.N. Skuratovskaya¹, I.I. Dorohova¹, A.V. Savyalov¹, A.V. Berdieva²

¹ Institute of Biology of the Southern Seas of Ukrainian Academy of Sciences, Sevastopol,
e-mail: kunast@rambler.ru

² The ichthyology study group of Ecological Center of Junior Academy of Science, Sevastopol

The data about Black Sea whiting state from 2002 to 2009 were presented. Fish of 0+ – 5 years were noticed in catches. Fish of age groups of 1+ and 2 were dominated. The known tendency of female prevalence in population were confirmed. The size and weight of *Merlangius merlangus euxinus* caught in 2002–2008 were close, but higher than in 1948–1991. The tendencies of

increasing of hepatosomatic index and condition factors and decreasing of gonadosomatic index were described. The differences between values of size, weight, morphophysiological indices of same age and sex fish from different bays can be explained by difficult population structure and differences in bays conditions at fattening and spawning.

РОЛЬ Na^+/K^+ АТФАЗЫ В БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Е. И. Кяйвярйнен¹, Е. В. Борвинская¹, Г. Г. Серпунин², М. М. Куклина³, Н. Н. Немова¹

¹ Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия
e-mail: hela_kaiv@mail.ru

² ГОУ ВПО Калининградский государственный технический университет,
г. Калининград, Россия

³ Учреждение Российской академии Мурманский морской биологический институт
Кольского научного центра РАН, г. Мурманск, Россия

Введение

Na^+/K^+ АТФаза – фермент активного транспорта, встроенный в наружную плазматическую мембрану клетки, обеспечивает перенос ионов Na^+ и K^+ против их концентрационного градиента и участвует в процессах осмотической и ионной регуляции. Помимо непосредственной функции – создания оптимального внутриклеточного соотношения ионов Na^+ и K^+ , этот фермент создает электрогенный мембранный градиент, который может обеспечивать перенос различных метаболитов, в том числе сахаров и аминокислот, через клеточную мембрану (Болдырев, 1998). В связи с важностью выполняемых функций, естественно предположить наличие сложной, гибкой, разноуровневой системы регуляции активности Na^+/K^+ АТФазы, которая является одним из ключевых ферментов, вовлеченных в регуляцию ответа организма на воздействие окружающей среды. Целью ионной регуляции организмов является поддержание во внутренней среде наиболее благоприятного соотношения ионов, необходимого для нормального функционирования макромолекул в клетках.

Выяснение роли и участия Na^+/K^+ АТФазы в биохимических механизмах развития адаптивных реакций в ответ на изменение факторов среды (абиотических и биотических) было проведено у различных объектов исследования: у рыб семейства осетровые – стерлядь (*Asipenser rutenus*) при адаптации к среде с различной соленостью и кислотностью и у птиц Баренцева моря: моевка (*Rissa tridactyla* L.), толстоклювые кайры (*Uria lomvia* L.), тонкоклювые кайры (*Uria aalge* Pontop L.) при гельминтной инвазии (биотический фактор).

Особенностью экологии эвригалинных видов, к которым относится стерлядь, является то, что в своем жизненном цикле они могут сталкиваться со значительными изменениями абиотических факторов среды обитания, в частности, солености и кислотности. Это положение справедливо и по отношению к стерляди, выдерживающей значения солености среды обитания до 10‰, тогда как для большинства представителей пресноводной ихтиофауны критическими являются значения выше 5–8‰ (Хлебович, 1974). Исследуемый диапазон кислотности среды (рН от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптивной нормы для стерляди. Уже первые детальное исследования экологии и физиологии разных видов осетровых показали высокую адаптивную пластичность, лежащую в основе биологического прогресса представителей этого семейства. Успех адаптации зависит от способности рыб перестраивать свой водно-солевой обмен. Учитывая генетическую близость стерляди к проходным осетровым, представляет интерес более глубокое раскрытие эффективных механизмов регуляции ионно-солевого баланса для поддержания устойчивости метаболизма в связи с проблемой возможной акклиматизации стерляди к водам Куршского залива Балтийского моря (Калининградская область).

Использование биохимических методов в эколого-паразитарных исследованиях на морских птицах актуальны, так как в циркуляции гельминтов в прибрежных морских экосистемах птицы играют особую роль (Куклин, Куклина, 2005). Птицы, используя в качестве пищевых объектов морских беспозвоночных и

рыб, зараженных гельминтами, становятся эндотермными хозяевами. Взаимоотношения в системе паразит-хозяин зависят от вида и свойств гельминта, и, с другой стороны, от интенсивности метаболизма хозяина. Паразитарная инвазия оказывает общее негативное воздействие на организм хозяина, но в его органах паразитарные семейства вызывают стимуляцию клеточного метаболизма для обеспечения собственной жизнедеятельности, так как гельминты не способны самостоятельно синтезировать многие вещества (Высоцкая, 1989). Гельминтная инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей, направленные на избирательное поглощение питательных веществ, и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в органах. Поскольку известна роль Na^+/K^+ -АТФазы в метаболизме клетки как одного из важнейших участников регуляции водно-солевого баланса и обеспечения переноса различных метаболитов, представляет интерес определить участие Na^+/K^+ -АТФазы в адаптациях организма морских птиц к паразитарной инвазии.

Материалы и методы

Исследование влияния абиотических факторов выполнено на сеголетках стерляди (*Asipenser ruthenus*), выращивание которой проводили в экспериментальных УЗВ (установки с замкнутым циклом водообеспечения) в аквариальной кафедре аквакультуры ФГОУ ВПО Калининградского Государственного технического

университета в течение 3 месяцев. В одной серии экспериментов по влиянию солености молодь стерляди выращивалась в трех аквариумах с различной концентрацией соли: I – 3‰; II – 6‰; III – контроль (0,3‰). В другой серии экспериментов по влиянию рН молодь выдерживалась в трех аквариумах с различными значениями рН: I – 7; II – 8; III – 9.

Добыча морских птиц производилась на мысе Крутик (Восточный Мурман) Баренцева моря. Препарирование птиц, получение биологического материала (печень), гельминтологическое обследование и видовая идентификация осуществлялась в секторе паразитологии ММБИ РАН (Куклин, Куклина, 2005). Исследованные кайры были заражены только цестодами: толстоклювые кайры цестодами сем. *Dilepithidae*, а тонкоклювые – цестодами сем. *Tetrabothriidae* и сем. *Hymenolepididae*. Моевки были поражены цестодами сем. *Tetrabothriidae*, сем. *Dilepithidae*, смешанное заражение цестодами сем. *Tetrabothriidae* и сем. *Dilepididae* и четвертая группа – трематодами *Cryptocotyle lingua*.

Активность Na^+/K^+ -АТФазы определяли по методу Елаева (Елаев и др., 1974), количество белка в пробе – по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

Результаты и обсуждение

Полученные данные по определению активности Na^+/K^+ -АТФазы в мышцах и жабрах стерляди, содержащейся в условиях различной солености, представлены на рисунке 1.

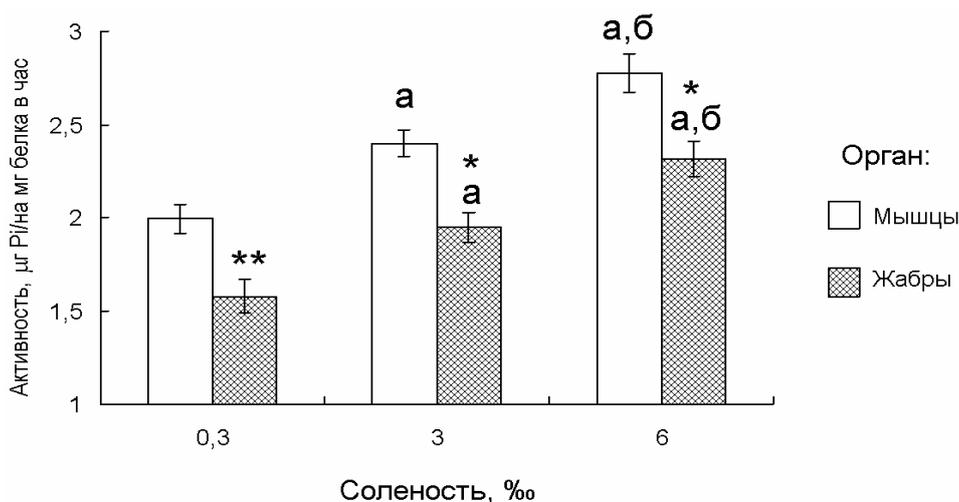


Рис. 1. Влияние солености среды на активность Na^+/K^+ -АТФазы ($M \pm \sigma$) в органах стерляди.

Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с соленостью в контроле 0,3 ‰ (а) и 3 ‰ (б).

Различия достоверны между органами при $p < 0,05$ (*), при $p < 0,01$ (**). Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Достоверно зафиксировано увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы ($p < 0,05$) в мышцах и жабрах при увеличении солености до 6‰. Это свидетельствует о том, что фермент обладает высокой чувствительностью к повышению этого фактора в данном диапазоне изменения солености, оказывающего однонаправленное влияние на его активность. Это связано с ролью Na^+/K^+ -АТФазы в метаболизме клетки как одного из важнейших участников регуляции водно-солевого баланса (Болдырев и др., 2006).

В жабрах рыб при повышении солености отмечают (Матей, 1996) увеличение числа ионотранспортирующих хлоридных клеток, при этом происходит увеличение суммарного количества сайтов Na^+/K^+ -АТФазы на плазматических мембранах. С этим связано увеличение экспрессии, а также активности Na^+/K^+ -АТФазы при повышении солености.

Возможно, именно увеличение проницаемости жаберного эпителия с повышением солености приводит к увеличению потока ионов в организм и активации ионотранспортных систем. Основными морфологическими структурами, ответственными за ионную регуляцию у различных видов рыб, являются эпителий жабр, почек и кишечника, органы выделительной системы, особенностью которых является наличие проницаемого эпителия. Из литературных источников известно, что у морских рыб таким органом является кишечник, в котором происходит впитывание проглоченной морской воды и избирательная абсорбция из неё ионов Na^+ и K^+ , а у пресноводных рыб, которым не нужно пить во-

ду, значительная осморегуляторная нагрузка ложится на почки (Матей, 1996; Виноградов, 2000). Многие исследования говорят о том, что обитающие в пресной воде рыбы характеризуются меньшей проницаемостью эпителия, чем морские, что связано с экономией ионов, в дефиците присутствующих в окружающей среде. Эту же тенденцию демонстрируют эвригалинные рыбы, проницаемость жабр для ионов у которых многократно снижается при переносе из морской воды в пресную (Виноградов, 2000).

При повышении рН среды наблюдалось снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (рис. 2). Так как ионы H^+ обмениваются на Na^+ из внешней среды с участием Na^+/H^+ -транспортера, работающего за счет градиента ионов Na^+ , непосредственно создаваемого Na^+/K^+ -АТФазой, поэтому наблюдаемое снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы при повышении рН от 7,0 до 9,0, предположительно, связано со снижением секреции ионов H^+ , в которой косвенно задействована Na^+/K^+ -АТФаза.

При повышении рН среды наблюдалось снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в жабрах и мышцах стерляди (рис. 2). Так как ионы H^+ обмениваются на Na^+ из внешней среды с участием Na^+/H^+ -транспортера, работающего за счет градиента ионов Na^+ , непосредственно создаваемого Na^+/K^+ -АТФазой, поэтому наблюдаемое снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы при повышении рН от 7,0 до 9,0, предположительно, связано со снижением секреции ионов H^+ , в которой косвенно задействована Na^+/K^+ -АТФаза.

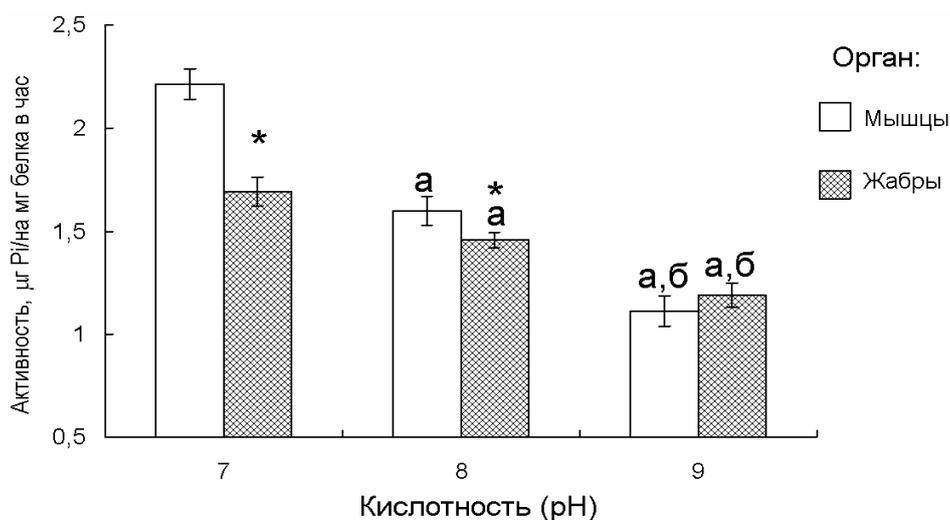


Рис. 2. Влияние кислотности среды на активность Na^+/K^+ -АТФазы ($M \pm \sigma$) в различных органах стерляди. Различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с рН=7 (а) и рН=8 (б). Различия достоверны между органами при $p < 0,05$ (*), при $p < 0,01$ (**). Критерий Вилкоксона-Манна-Уитни

Многие исследования демонстрируют повышение активности и экспрессии этого транспортного белка при адаптации рыб к закислению окружающей среды (Choe K.P., 2002; Hirata T., 2003), указывая на важную роль Na^+/H^+ обменных процессов в регуляции кислотно-щелочного равновесия (Виноградов, 2000).

Также следует отметить, что снижение активности в жабрах идет медленнее, чем в мышцах. Это может быть результатом большей приспособленности жабр к колебаниям внешних факторов среды, что связано с наличием эволюционно выработанных приспособительных реакций к непосредственному контакту с постоянно изменяющейся внешней средой. Существует гипотеза, что решение проблемы регуляции кислотно-щелочного баланса было первейшей задачей жаберного эпителия рыб, заселивших континентальные водоемы, которые, по сравнению с морскими, отличаются значительными колебаниями этого фактора (Виноградов, 2000).

Щелочная среда благоприятствует снижению проницаемости жабр. Это приводит к уменьшению диффузной потери основного внеклеточного Na^+ , в результате чего общий уровень их потери не будет превышать поглощение (Виноградов, 2000). Вероятно, с замедлением поступления ионов в организм может быть связано понижение уровня активности Na^+/K^+ -АТФазы, в том числе и в мышцах, где при $\text{pH}=9,0$ ее значение становится меньше, чем в жабрах.

Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей, в основном, выработанным в процессе эволюции физиологическим значением pH среды 6,0–8,0. pH -оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. При этом некоторые из них выдерживают сильные колебания pH и восстанавливают свою активность при возвращении к оптимальным условиям.

Исследуемый диапазон солености до 6‰ и кислотности среды (pH от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптивной нормы для стерляди. Полученные данные продемонстрировали, что активность Na^+/K^+ -АТФазы стерляди находится в прямой зависимости от солености внешней среды (в диапазоне до 6‰) и в обратной зависимости от увеличения pH среды (при изменении pH от 7,0 до 9,0). Известно, что нарастание количественного значения какого-либо абиотического фактора до определенной критической точки благоприятно для организма, а затем становится отрицательным. Согласно данным Хо-

чачка, при отклонении от оптимальных значений включаются компенсаторные механизмы, снижающие даже стрессовое воздействие факторов (Хочачка, 1994). Раскрытие эффективных механизмов ионной и осмотической регуляции для поддержания устойчивости метаболизма в связи с проблемой возможной акклиматизации стерляди к условиям повышенной солености указывает на приспособительный характер реактивности ферментов активного транспорта ионов Na^+ и K^+ при изменении солености и pH среды обитания стерляди *Acipenser ruthenus L.* в диапазоне докритических значений.

Большее разнообразие гельминтофауны у моевок и различия в зараженности гельминтами двух типов кайр, ареалы обитания которых совпадают, вызвано их пищевыми предпочтениями. Моевки по типу питания относятся к полифагам, включают в свой рацион кроме рыб беспозвоночных, в частности, моллюсков и ракообразных. В связи с этим у них более широко представлен спектр гельминтофауны. Основу питания тонкокловых кайр составляет только рыба, а толстокловые кайры наряду с разными видами рыб потребляют ракообразных. В результате особенностей экологии двух близких видов кайр (Bartlett R. T. et al, 1997), переключения ихтиофагов на измененное питание происходит заражение неспецифическими для данного вида хозяев паразитами.

В проведенном эксперименте выявлено, что в ответ на инвазию паразитами различной таксономической принадлежности, попадающими в организм морских птиц – баренцевоморской моевки и кайр с пищей (рыбой и морскими беспозвоночными) в их печени происходит активация Na^+/K^+ АТФазы (рис. 3, 4).

В печени моевок (рис. 3) эффект совместной инвазии паразитами семейств *Dilepididae* и *Tetrabothriidae* оказывается более выраженным по сравнению с влиянием отдельного (синглетного) заражения паразитами указанных семейств.

У тонкокловых и толстокловых кайр паразитарная инвазия также вызывает в печени рост активности Na^+/K^+ АТФазы (рис. 4).

У толстокловой кайры наибольший эффект вызывало заражение цестодами *Hymenolepididae*. Возрастание активности Na^+/K^+ -АТФазы в печени морских птиц при зараженности паразитами разных семейств позволяет подтвердить участие данного фермента в ответной реакции плазматических мембран клетки. Реактивность ферментов активного транспорта ионов Na^+ и K^+ в ответ на па-

разитарную инвазию зависит от вида организма – паразита. Показано, что один из механизмов адаптации организма хозяина к воздействию представителей различных семейств паразитов связан с включением механизмов, повышающих прони-

цаемость мембран для ионов и различных метаболитов. Направленность и амплитуда изменения изученных показателей зависела от вида гельминта, особенностей экологии и специфичности хозяина.

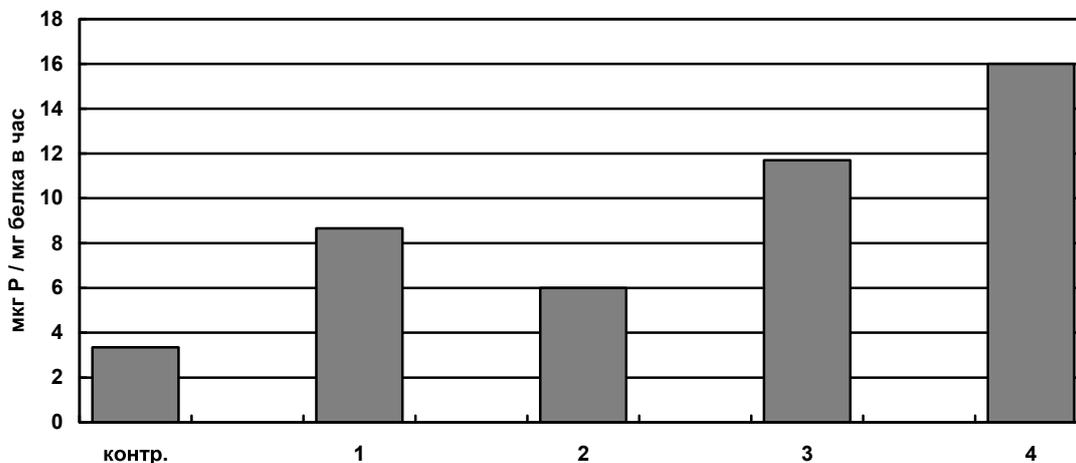


Рис. 3. Активность Na^+/K^+ АТФазы (мкг фосфора/мг белка в час) в печени мюевки при инвазии различными семействами паразитов: 1 – *Dilepididae*; 2 – *Tetrabothriidae*; 3 – смешанное *Dilepididae* и *Tetrabothriidae*; 4 – Трематоды

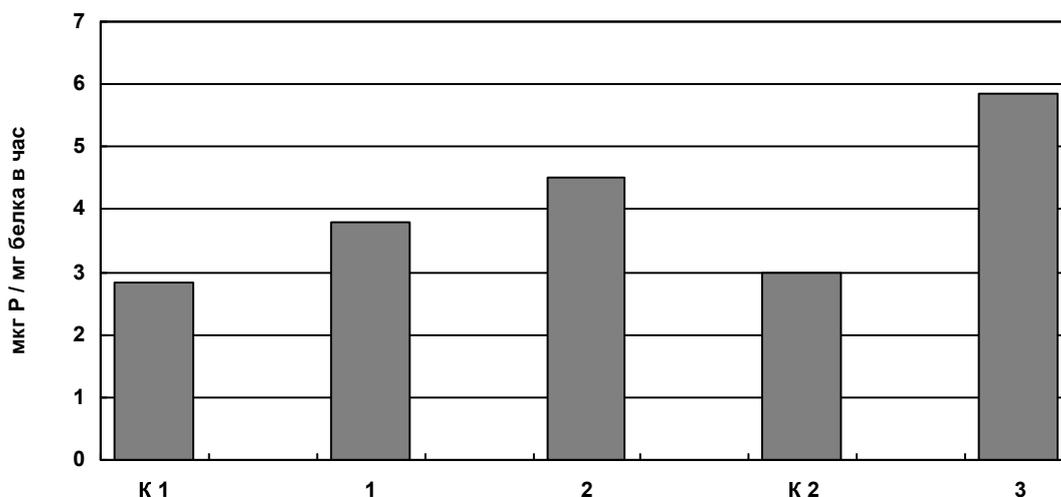


Рис. 4. Активность Na^+/K^+ АТФазы (мкг фосфора/мг белка в час) в печени кайр (К 1 – толстоклювые кайры, контроль; К 2 – тонкоклювые кайры, контроль) при инвазии различными семействами паразитов (1, 2 – толстоклювые кайры; 3 – тонкоклювые кайры): 1 – *Tetrabothriidae*; 2 – *Hymenolepididae*; 3 – *Dilepididae*

Изменение биохимического статуса исследуемых организмов в различных экологических ситуациях включают в себя изменение метаболических функций Na^+/K^+ -АТФазы, направленных на компенсацию возможных негативных последствий таких воздействий, чтобы сохранить целостность макромолекул и поддержать

регуляторные механизмы метаболизма на уровне, необходимом для осуществления жизненно важных функций организма.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-0140а и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4

Литература

- Болдырев А. А. Na^+/K^+ -АТФаза. Свойства и биологическая роль. Соросовский образовательный журнал, № 4, 1998. С. 2–10.
- Болдырев А. А., Кяйвяряйнен Е. И., Илюха В. А. Биомембранология. Петрозаводск: Из-во КарНЦ РАН, 2006. 226 с.
- Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
- Высоцкая Р. У. Сравнительная биохимия гельминтов рыб / Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров – Л.: «Наука», 1989. – 151 с.
- Елаев Н. Р., Семенов Е. В. Изменение активности мембранных АТФаз мозга при воздействии холино- и адrenomиметических веществ // Биохимия. 1974. Т. 39, вып. 3. С. 636–640.
- Куклин В. В., Куклина М. М. Гельминты птиц Баренцева моря: фауна, экология, влияние на хозяев Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2005. – 299 с.
- Матей В.Е. Жабры пресноводных костистых рыб. Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция. – Санкт-Петербург: Наука, 1996. – 204 с.
- Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Л., 1974. – 230 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 396 с.
- Barrett R. T., Anker-Nilssen M T., Krasnov Yu.V. Can northern razor-bill *Alca torda* be identified by their measurements? / R. // Var. Ornithol. – 1997. – Vol. 25. – P. 5–8.
- Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // M.M. Bradford.// Anal Biochem. – 1976. – № 10 – P. 491–497.
- Choe K.P., Morrison-Shetlar A.I., Wall B.P., and Claiborne J.B. Immunological detection of Na^+/H^+ -exchangers in the gills of a hagfish, *Myxine glutinosa*, an elasmobranch, *Raja erinacea*, and a teleost, *Fundulus heteroclitus*. Comp Biochem Physiol A Physiol 131: 375–385, 2002.
- Hirata T., Kaneko T., Ono T., Nakazato T., Furukawa N., Hasegawa S., Wakabayashi S., Shigekawa M., Chang M.H., Romero M.F., Hirose S. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3,5 lake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284: R1199–R1212, 2003.

ROLE OF Na^+/K^+ ATPASE IN THE BIOCHEMICAL MECHANISM OF ADAPTATION TO ABIOTIC AND BIOTIC ENVIRONMENTAL FACTORS

E.I. Kaivarainen¹, E.V. Borvinskaya¹, G. G. Serpunin², M.M. Kuklina³, N.N. Nemova¹

¹ *Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia, e-mail: hela_kaiv@mail.ru*

² *Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia*

³ *Murmansk Marine Biological Institute Kola Scientific Centre of RAS, Murmansk, Russia*

The lead experiment has shown reactivity of enzymes of osmoregulation Na^+/K^+ -ATPase to changing ecological factors of environment, such as increase of salinity and pH, that underlies the adaptive reactions developed at eurygallinic kinds of fishes to

which the sterlet is concerned. Also it was investigated the influence of different kind of helminthes on this biochemical parameter of birds and it was shown that the permeability of membranes for ions and various metabolites was higher than in control bird group.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИНДЕКСЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БИОТЫ В ЭСТУАРНЫХ ЗОНАХ

О. Н. Лукьянова, С. А. Ирейкина

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр),
г. Владивосток, Россия,
e-mail: onlukyanova@tinro.ru

Эстуарные экосистемы как природные границы между материками и океанами являются особенно изменчивыми и уязвимыми, и в значительной степени подвержены влиянию антропогенного загрязнения. Особенности эстуариев выражаются, прежде всего, в пониженной солености и ее значительном непостоянстве в пространстве и во времени. Вариабельность физико-химических факторов может изменять биодоступность и, соответственно, токсичность поллютантов. Присутствие большого количества органики в этих зонах обычно приводит к истощению кислорода, что негативно сказывается на метаболизме обитающих здесь организмов. Некоторые поллютанты могут прямо или косвенно изменять баланс между концентрацией прооксидантов во внешней среде и активностью антиоксидантов внутри клеток, вызывая развитие окислительного стресса. Загрязнение в эстуарных районах часто является критическим фактором, т.к. высокая вариабельность абиотических условий усиливает неблагоприятное воздействие на организмы, живущие в этих условиях.

Залив Петра Великого расположен в северо-западной части Японского моря, в умеренной зоне с муссонным климатом. На берегах залива расположены крупные города-порты Владивосток и Находка, находятся многочисленные промышленные и сельскохозяйственные предприятия. Наибольшее количество бытовых стоков от населенных пунктов поступает в акваторию практически неочищенными (Нигматулина, 2007). В донных отложениях и воде залива отмечены повышенные концентрации тяжелых металлов (Ковековдова, Симоконь, 2004) и хлорорганических пестицидов (Tkalin et al., 1997).

В залив впадает множество рек с различным объемом стока, крупнейшей из которых является река Раздольная, берущая начало на территории Китая и выносящая в море наибольшее

количество загрязняющих веществ. Водосборные бассейны рек отличаются по степени антропогенной трансформации. В наибольшей степени подвержены техногенному загрязнению реки Раздольная и Артемовка, к умеренно загрязненным можно отнести реки Тесная, Суходол и Шкотовка (рис. 1).

При изучении состояния биоты в эстуарных зонах очень важным является выбор организмов-индикаторов. Они должны быть не только широко распространены, доступны для сбора и чувствительны к внешним воздействиям, но и адаптированы к жизни в экстремальных условиях среды обитания. В каждой климатической зоне следует выбирать и использовать свой набор индикаторных видов и специфических реакций, которые адекватно отражают существование биоты в конкретной биогеографической зоне, со сложившимся комплексом природных и антропогенных факторов (Bartell, 2006). В наших исследованиях в качестве вида-индикатора впервые для залива Петра Великого был выбран японский мохнаторукий краб *Eriocheir japonica*, жизненный цикл которого связан с эстуариями. *E. japonica* – вид субтропический и его жизненный цикл в водах Приморья (у северного края ареала) имеет ряд особенностей (Семенькова, 2007). Самки вынашивают яйца в эстуариях и морском побережье летом, здесь же происходит развитие и осажение планктонных личинок, которые к осени мигрируют в верхнюю часть эстуария, где превращаются в ювенильных особей. Несколько лет краб живет в реке, затем у него происходит линька (летом), после чего половозрелые крабы мигрируют в морское побережье (весной). Японский мохнаторукий краб – вид моноциклический, после размножения и выпуска личинок взрослые особи в массе гибнут. Таким образом, оптимальный период для сбора животных – начало лета и осени.

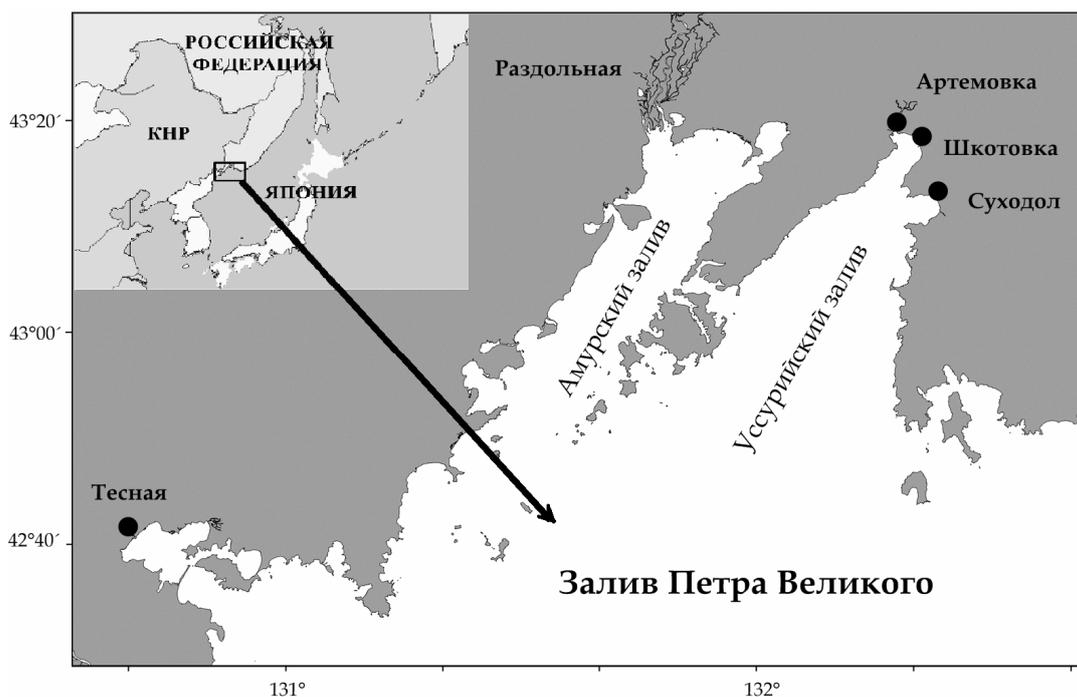


Рис. 1. Карта-схема района работ

Определение показателей окислительного стресса в водных организмах является примером неспецифических молекулярных биомаркеров, которые успешно применяются в полевых условиях с целью характеристики импактных районов, где обычно присутствует смесь поллютантов. Их также используют при изучении состояния биоты в эстуариях различных рек мира (Basanskas et al., 2004; Paital, Chainy, 2010).

Крабы были собраны в эстуариях пяти рек бассейна залива Петра Великого весной и летом 2007–2010 гг. Крабов отлавливали в приустьевых зонах рек Раздольная, Артемовка, Суходол, Шкотовка и Тесная, в живом виде доставляли в лабораторию и препарировали на льду. В некоторых случаях животных замораживали при -20°C и анализировали в течение 2–3-дней после заморозки. Навески органов (жабры) массой около 1 г гомогенизировали в 0,05 М трис-НСI буфере рН 7,5 в ледяной бане. Полученные гомогенаты центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. В супернатантах определяли концентрацию белка по методу Гринберга (Greenberg, Gaddock, 1982). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов анализировали в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по количеству образовавшегося малонового диальдегида (Porter et al., 1976). Активность глутатион-S-трансферазы определяли с субстратом 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig et al., 1974),

каталазы – с перекисью водорода (Королюк и др., 1988).

Степень перекисного окисления липидов характеризует состояние липидов мембран. Как правило, при неблагоприятных условиях, при действии повреждающих факторов, в том числе токсикантов различной природы, уровень малонового диальдегида (МДА), как показателя количества перекисных соединений в мембранах, увеличивается (Hugget et al., 1992). Следует ожидать, что высокое содержание МДА будет у животных в неблагоприятных условиях. Во всех исследованных пробах концентрация МДА в жабрах крабов была невысокой (рис. 2). Наибольшая концентрация МДА обнаружена у животных из эстуария р. Тесная – 1,7, наименьшая – у крабов из эстуария р. Шкотовка, 0,6 нмоль МДА/мг белка. Следовательно, по данному показателю можно заключить, что в наихудшем состоянии находятся крабы из эстуария р. Тесная.

Перекисное окисление липидов является интегрирующим показателем, по которому судят о степени развития окислительного стресса в клетках органов животных. Препятствуют свободнорадикальному окислению различные ферментативные и неферментативные компоненты (низкомолекулярные сквенджеры) антиоксидантной системы. Фермент каталаза расщепляет образующуюся перекись водорода, обладающую сильными токсическими свойствами

(Lemaire, Livingstone, 1993). Каталаза активируется при умеренном загрязнении и ингибируется высокими концентрациями токсикантов. Активность фермента была сходной у крабов из эстуариев Раздольной, Суходола и Артемовки во

все годы исследования, варьируя от 16 до 25 ед. акт./мг белка. Минимальная активность установлена у крабов из эстуария р. Тесная, 5 ед./мг белка, что отражает депрессивное состояние животных в данном районе (рис. 3).

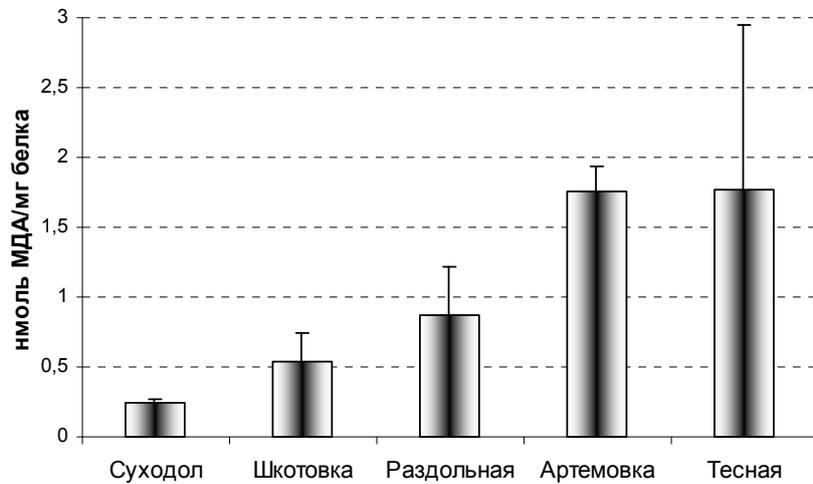


Рис. 2. Уровень перекисного окисления липидов в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

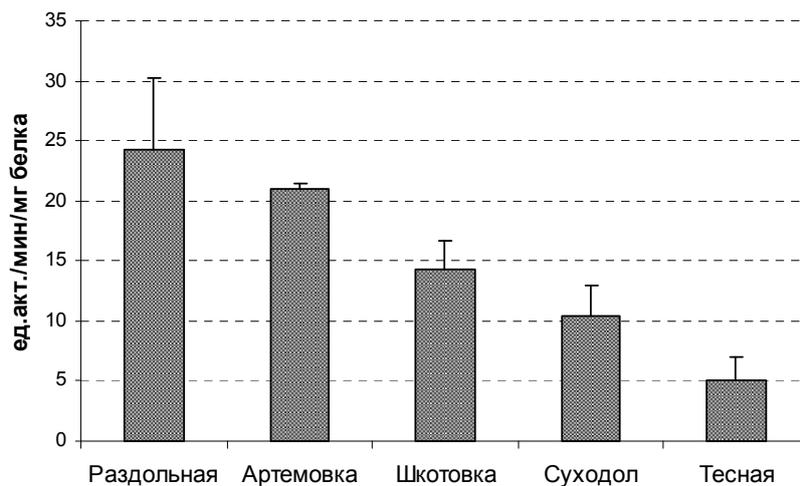


Рис. 3. Активность каталазы в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

Глутатион-S-трансфераза (GST) катализирует биотрансформацию гидрофобных субстратов за счет сульфгидрильных групп внутриклеточного глутатиона. Фермент обладает редуктазной и трансферазной активностями. При поступлении в организм повышенного количества экзогенных токсикантов активность фермента, как правило, повышается (Leaver, George, 1998).

Активность фермента была сходной у крабов из эстуариев рек Раздольная, Суходол, Артемовка и Шкотовка, составляя диапазон от 25 до 36 мкг/мин/мг белка (рис. 4). Несколько повышен-

ной можно считать активность GST у крабов из эстуария р. Тесной, среднее значение которой достигало 42 мкг/мин/мг белка.

Таким образом, на основании исследования физиологического состояния мохнаторукого краба их эстуариев некоторых рек залива Петра Великого в течение четырех лет можно заключить, что наибольший стресс испытывают крабы из эстуария р. Тесной, где отмечен максимальный уровень перекисного окисления липидов, ингибирование каталазы и повышенная активность GST. Состояние крабов из эстуариев

рек Раздольной, Суходол, Артемовка и Шкотовка можно считать сходным, о чем свидетельствуют близкие значения трех исследованных параметров. Река Тесная находится в юго-западной части залива и впадает в залив Посьета (залив второго порядка залива Петра Великого). Этот район подвержен влиянию стока реки Туманной (Туманган), протекающей по территории КНР и КНДР и являющейся границей между Россией и этими странами. Воды реки и устьевая зона загрязнены целым комплексом различных антропогенных соединений (Тарасов и др., 2004). Поллютанты с течениями

могут проникать в залив Посьета и оказывать влияние как на прибрежную, так и эстуарную фауну.

Для комплексной количественной характеристики физиологического состояния крабов из различных районов был рассчитан интегральный биохимический индекс (ИБХИ) (табл. 1). Индекс вычислен как сумма величины активностей ферментов и концентрации малонового диальдегида, выраженных в процентах от максимального значения, и составил: Артемовка – 93%, Суходол, Раздольная, Тесная – 74%, Шкотовка – 55%.

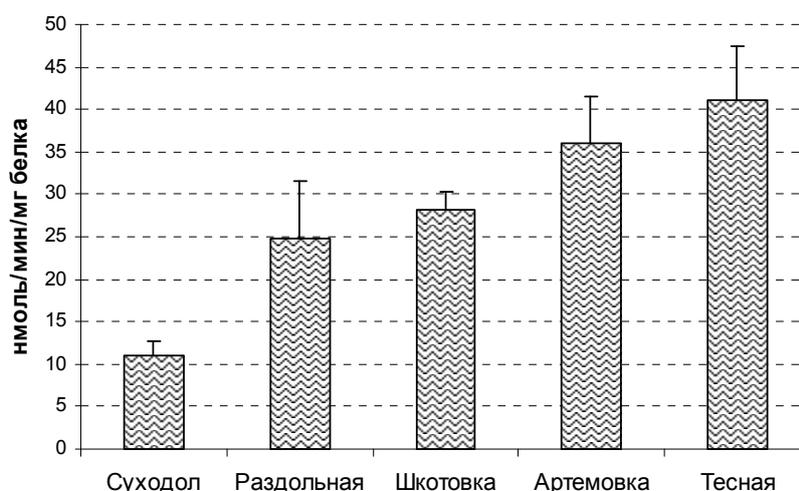


Рис. 4. Активность глутатион-S-трансферазы в жабрах краба *E. japonica* из эстуариев рек залива Петра Великого ($M \pm m$, $N = 4$)

Таблица 1. Значение интегрального биохимического индекса в жабрах мочнаторукого краба из различных эстуарных зон залива Петра Великого

Активность	Раздольная	% max	Суходол	% max	Артемовка	% max	Тесная	% max	Шкотовка	% max
ГСТ	$\frac{24-36^*}{30}$	73	$\frac{27-35}{31}$	75	35	85	41	100	28	68
Каталаза	$\frac{19-24}{22}$	100	18,5	82	21	95	5,0	23	14,2	67
ПОЛ	0,87	49	1,2	67	1,76	100	1,77	100	0,54	30
Сумма Σ		222		224		280		223		165
ИБХИ ($\Sigma/3$)		74		74		90		74		55

* – В числителе – диапазон значений, в знаменателе – средняя величина

Параллельно с определением молекулярных биомаркеров была проанализирована токсичность грунтов (методом биотестирования с использованием планктонных рачков мизид в качестве тест-объектов) и содержание нефтяных углеводородов (НУ) в грунтах и воде с тех же станций. На основании полученных данных был рассчитан индекс загрязнения, или интегральный абиотический индекс (ИАИ) как сумма степени токсичности (в % от максимальной) и со-

держания НУ в абиотических компонентах экосистемы (также в % от максимальной) (табл. 2). Интегральный абиотический индекс (ИАИ) составил 92% для Раздольной, 74% для Артемовки, 52% для Тесной, 43% для Суходола и 37% для Шкотовки.

Суммарный индекс загрязнения, рассчитанный как сумма ИБХИ + ИАИ, позволил ранжировать эстуарные зоны в следующем порядке: Раздольная = Артемовка (суммарный индекс 167);

Тесная = 126; Суходол = 117, Шкотовка = 92. Таким образом, в отличие от данных по определению отдельных параметров окислительного стресса, ИБХИ указывает на наилучшее состоя-

ние животных и среды в эстуарии р. Шкотовка, а наихудшее – в эстуариях Раздольной и Артемовки, что соответствует известной степени антропогенного воздействия в бассейнах этих рек.

Таблица 2. Интегральный абиотический индекс (ИАИ) для различных эстуарных зон залива Петра Великого

Показатель	Раздольная	% max	Суходол	% max	Артемовка	% max	Тесная	% max	Шкотовка	% max
Токсичность		100		60		100		100		60
НУ, грунты	39	76	24	47	51	100	25–29	54	15	29
НУ, вода	190	100	42	22	45	23	5	3	45	23
Сумма Σ		276		129		223		157		112
ИАИ (Σ/3)		92		43		74		52		92

Коэффициент корреляции между ИБХИ и ИАИ составил 0,78. Следовательно, ИБХИ у эстуарных организмов с высокой степенью достоверности отражает антропогенное воздействие на

конкретную экосистему. Вычисление подобных интегральных индексов позволяет дать комплексную оценку состояния водных организмов в акваториях с различной степенью загрязнения.

Литература

Ковековдова Л. Т., Симоконов М. В. Тенденции изменения химико-экологической ситуации в прибрежных акваториях Приморья. Токсичные элементы в донных отложениях и гидробионтах // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 137. С. 310–320.

Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. С. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.

Нигматулина Л. В. Оценка антропогенной нагрузки береговых источников на Амурский залив (Японское море) // Вестник ДВО РАН. 2007. № 1. С. 73–77.

Семенькова Е. Г. Биология и перспективы промысла японского мохнаторукого краба *Eriocheir japonica* в водоемах Приморья: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток: ТИНРО-Центр, 2007. 24 с.

Тарасов В. Г., Мощенко А. В., Питрук Д. Л. Трансграничное загрязнение российских вод // Дальневосточный морской биосферный заповедник. Исследования. Т. 1. Вл-к: Дальнаука, 2004. С. 305–313.

Bacanskas L.R., Whitaker J., Di Giulio R.T. Oxidative stress in two populations of killifish (*Fundulus heteroclitus*) with differing contaminant exposure histories // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 597–601.

Greenberg C.G., Gaddock P.R. Rapid single-step membrane protein assay // Clin. Chem. 1982. Vol. 28. № 7. P. 1725–1726.

Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathion-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 7130–7139.

Hugget R.J. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. 1992, Lewis Publishers: Chelsea, MI, USA. P. 235–335.

Lemaire P., Livingstone D.R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussels *Mytilus edulis* // Trends Comp. Biochem. Physiol. 1993. Vol. 1. P. 1119–1150.

Paital B., Chainy G.B.N. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity // Comp. Biochem. Physiol. 2010. Vol. 151 C, P. 142–151.

Porter N.A., Nolon Y., Ramdas L. Cyclic peroxides and thiobarbituric assay // Biochem. Biophys. Acta. 1976. Vol. 441. P. 506–512

Tkalin A.V., Lishavskaya T.S., Hills J.W. Organochlorine pesticides in mussels and bottom sediments from Peter the Great Bay near Vladivostok // Ocean Res. 1997. Vol. 19. P. 115–119.

BIOCHEMICAL INDICES FOR BIOTA ASSESSMENT IN ESTUARIES ZONES

O.N. Lukyanova, S.A. Ireykina

Pacific Research Fisheries Centre (TINRO-Centre)

e-mail: onlukyanova@tinro.ru

Pollution in estuarine areas often is the critical factor, since high variability of environmental parameters influence on organisms. Many rivers with different anthropogenic transformation degree

run into Peter the Great Bay (Japan/East Sea). Molecular biomarkers of biotransformation and oxidative stress were determined in crab *Eriocheir japonica* collected in five estuaries of the Bay. The

integrated biochemical index (IBCI) was calculated as a sum of enzymatic activity and lipid peroxidation level, expressed in percentage of the maximal value. Acute toxicity of bottom sediments determined by biotesting with mysid shrimps, and petroleum hydrocarbons content in bottom sediments and seawater from the same stations were also analyzed,

and an integrated abiotic index (IAI) was computed. Total index of pollution, calculated as IBCI + IAI, allowed ranging the estuarine zones. The correlation coefficient between IBCI and IAI was 0,78. Thus, IBCI at estuarine organisms with a high degree of reliability reflects anthropogenic influence on a specific ecosystem.

ВЛИЯНИЕ Sr^{2+} НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ Ca^{2+} -ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ РЫБ

Л. А. Лысенко¹, Н. П. Канцерова¹, Е. И. Кяйвярйнен¹, Н. Н. Немова¹, Н. А. Кашулин²

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия, e-mail: l-lysenko@yandex.ru

² Учреждение Российской академии наук Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН, г. Апатиты Мурманской обл., Россия

Введение

Загрязнение водоемов тяжелыми металлами – один из наиболее распространенных видов антропогенного воздействия. В тканях многих водных организмов, включая планктонные, бентосные виды, моллюсков, рыб, накапливаются тяжелые металлы (Брень, 1999; Попов и др., 2002), при этом зачастую наблюдается прямая корреляция между концентрациями металлов в донных седиментах (антропогенной составляющей) и гидробионтах. Степень накопления металла в тканях рыб является переменной величиной, находящейся в тесной взаимосвязи с геохимическими условиями среды их обитания (концентрации металла, биодоступности его соединений, температуры, pH и жесткости воды), с генеративным и пластическим обменом у рыб и другими факторами. Обнаруживаемые в организме концентрации металлов отражают разницу между количеством поглощенного элемента (нагрузка) и выведенного из организма. Аккумулированные металлы вызывают метаболические нарушения в органах рыб и беспозвоночных. Хроническое поступление стронция в окружающую среду, например, в составе стоков металлургического производства, вызывает дозо- и время-зависимое накопление металлов в живых организмах и представляет для них серьезную опасность из-за выраженной способности этого токсичного элемента к накоплению в тканях, особенно костной.

Проведены исследования биохимических параметров в тканях рыб сем. Сиговые, сига обыкновенного, *Coregonus lavaretus* (L.), и ряпушки европейской, *Coregonus albula* (L.), выловленных в 2003 г. в озерах Ковдор и Нижняя Пиренга (Мурманская обл.). Для более детального понимания причин нарушений, на-

блюдаемых у рыб озера Ковдор на организменном и популяционном уровнях, сотрудниками ИППЭС КНЦ РАН было проанализировано содержание металлов (никеля, меди, цинка, марганца, стронция и других) в органах сига и ряпушки (Кашулин, 1999; Королева, 2001). По результатам их исследований приоритетным загрязнителем вод оз. Ковдор признан стронций. Стронций (Sr) представляет серьезную опасность для позвоночных животных из-за его структурного сходства с кальцием (Ca), которое обуславливает способность Sr замещать Ca в костной и других тканях. Следствием этого является нарушение обмена кальция в организме, а также его участия в кальций-зависимых метаболических процессах. В представленной работе с целью выявления возможного механизма действия стронция анализируются структурно-функциональные изменения в одной из протеолитических систем клетки, регулируемой внутриклеточным Ca^{2+} , а именно Ca^{2+} -активируемых протеиназ (кальпаинов) и их специфического эндогенного ингибитора (кальпастина).

Материалы и методы

Объектами исследования были рыбы сем. Сиговые сига *Coregonus lavaretus* (L.) и ряпушка *C. albula* (L.) из водоемов Мурманской обл., различающихся по степени техногенного загрязнения – оз. Нижняя Пиренга (контроль) и оз. Ковдор (опыт).

Гидробиологическая характеристика исследуемых озер

Качество вод озера Нижняя Пиренга является удовлетворительным, хотя присутствуют несколько дистанцированных (25–70 км) ис-

точников загрязнения: горно-обогатительные предприятия ОАО «Ковдорский ГОК», ОАО «Ковдорслюда» и рудник «Енский». Содержание потенциально опасных элементов, таких как цинк, медь, никель, кобальт, хром, кадмий, в этом озере не превышает ПДК для рыбохозяйственных водоемов (табл. 1). По оценке биомассы зоопланктона озеро оценивается

как малокормное. Анализ уловов 2003 года показал, что преобладающим видом рыб в озере (86%) является сиг *C. lavaretus* L., а именно его малотычинковая форма. Соотношение полов в период отлова составляло 1 : 1,1 с незначительным преобладанием самок. Сиги озера Н. Пиренга имеют высокий коэффициент упитанности – 1,32.

Таблица 1. Содержание элементов (мкг·л⁻¹, средние величины) в исследуемых водоемах

	Cu	Ni	Cr	Co	Cd	Zn	Mn	Al	Sr
Оз. Ниж. Пиренга	0,5	1,1	1,3	<0,2	<0,05	0,7	5,0	23	64
Оз. Ковдор	1,5	1,2	0,85	1,5	<0,05	2,2	30	83	1210

Оз. Ковдор испытывает значительную антропогенную нагрузку со стороны горнообогатительных комбинатов, и в наших исследованиях рыбы из этого озера рассматривались как опытная группа. Гидрохимический состав оз. Ковдор характеризуется высоким содержанием ионов никеля, цинка, марганца, кобальта, алюминия и стронция (табл. 1). Оз. Ковдор характеризуется средним и в отдельных зонах повышенным уровнем трофности, кормовая база оценивается как достаточная. В исследуемый период значительно сократились уловы рыб. Доля сиговых рыб в уловах составляет более 99%, при этом по численности и биомассе доминирует ряпушка *C. albula* L. (планктонофаг), а сиг (бентофаг) практически отсутствует. Сиги оз. Ковдор представлены двумя формами: малотычинковой, характеризующейся бентосным или смешанным типом питания, и среднетычинковой, питающейся преимущественно зоопланктоном. Соотношение полов в изучаемый период составляло 1,2 : 1 с незначительным преобладанием самцов. Сиги, обитающие в оз. Ковдор, имеют высокий коэффициент упитанности – 1,4, при этом более 45% особей характеризуются максимальными значениями жиронакопления (в баллах), часто встречается ожирение сердца. Характерно, что у нерестовых самок обнаруживаются значительные количества полостного жира, что нехарактерно для рыб из северных водоемов. Наряду с этим, для сигов оз. Ковдор характерно развитие ряда патологий внутренних органов пищеварительной, выделительной и репродуктивной систем, снижение темпов роста и продолжительности жизни, раннее созревание и др. Более чем у 50% выловленных рыб наблюдались измененные цвет и форма печени, соединительно-тканые разрастания и атрофия паренхимы почек. Не-

обходимо указать на ухудшенные органолептические качества сигов, обитающих в оз. Ковдор: филе рыб имеет ярко выраженный посторонний вкус и запах, усиливающийся при термической обработке.

Выделение и изучение свойств кальпаинов и кальпастатина из органов рыб

Активность и структурно-биохимические характеристики Ca²⁺-зависимых протеиназ цитозоля (кальпаинов) и их белкового ингибитора кальпастатина оценивали после предварительной гель-хроматографии образцов на колонках (2,5×95 см) с гелем Сефакрил S-300 (Pharmacia), уравновешенным буфером А (10 mM трис-НСl (рН 7,5), содержащим 50 mM NaCl, 4 mM EDTA, 5 mM меркаптоэтанол). Наносили 25%-ные супернатанты цитозольной фракции тканей () рыб (105 тыс.г.×60 мин) в буфере А, содержащем 0,25 М сахарозы (рН 7,5). Элюцию проводили со скоростью 24 мл/ч буфером А, во фракциях элюента объемом 4 мл определяли активность Ca²⁺-активируемых протеиназ стандартным методом по гидролизу щелочно-денатурированного казеина (Murachi et al., 1981)[17]. Реакционная смесь для обоих кальпаинов включала 0,4% казеина, 5 mM дитиотреитола, 50 mM имидазол-НСl буфера (рН 7,5) и ферментный раствор, инкубация проводилась в присутствии 3,0 mM CaCl₂ (в холодные пробы кальций добавлялся после инкубации). По истечении 30 мин. инкубации (30 °С) реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 10% ТХУ. Концентрацию кислоторастворимых продуктов гидролиза определяли спектрофотометрически (E₂₈₀). Единица активности (ЕА) кальпаинов определялась как количество фермента во фракции, вызывающее увеличение на 1,0 оптического поглощения (E₂₈₀) за 30 мин. инкубации (30 °С).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили стандартным методом (Laemmli, 1970); разделяющий гель 13,5%, концентрирующий – 7,5%. Нагревание проб не проводилось, учитывая высокую нестабильность ферментов. Окраска гелей проводилась Coomassie blue (Hames, 1990). В качестве маркеров использовали стандартную смесь белков с известными молекулярными массами (SDS 6H, Sigma-Aldrich).

Количественное содержание водорастворимого белка в тканях (мг/мл центрифугата) определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Таблица 2. Содержание элементов (мкг·г⁻¹ сухого веса, средние величины) в органах сига из оз. Ковдор (по данным Кашулин, 1999; Королева, 2001)

Орган	Cu	Ni	Cr	Co	Cd	Zn	Mn	Al	Sr	n
Жабры	1,8	1,7	0,4	0,6	0,01	283	16,9	32	412,2	16
Печень	18,9	0,6	0,03	0,4	0,09	225	8,29	4,80	2,6	16
Почка	6,5	0,8	0,1	2,2	0,34	217	3,0	24	10,9	16
Мышцы	1,2	0,8	0,04	0,14	0,00	26	1,1	2,7	15,1	16
Скелет	0,5	1,2	0,07	1,2	0,00	164	16,8	11,1	1243	16

В исследовании выявлена органная специфичность накопления стронция и других тяжелых металлов у рыб исследованных видов (табл. 3). Так, стронций накапливается в костной ткани сигов в очень высоких концентрациях: в скелете его концентрация приближается к содержанию элемента в воде (1243 мкг·г⁻¹ и 1210 мкг·л⁻¹, соответственно), в других органах уровень накопления значительно ниже. Значительные количества обнаруживаются в жабрах, ниже уровень в скелетных мышцах и почках, в печени аккумуляция минимальная. Таким образом, содержание Sr особенно высоко в органах, выполняющих частично или полностью опорную функцию и состоящих из костной ткани, в жабрах такими опорными элементами являются скелетные жаберные дуги. Накопление металла в паренхиматозных органах (печень, почки) и скелетных мышцах минимальное. У ряпушки наиболее высокие концентрации Sr также обнаружены в костной ткани, в жабрах его содержание почти в 3 раза ниже, а в паренхиматозных органах и мышцах на порядок ниже, чем в скелете. Характерно, что в скелетных мышцах рыб, богатых кальцием, накопление данного элемента выше, чем в почках и печени. Межвидовые различия достоверны; уровень накопления стронция в тканях сигов выше, чем у ряпушки.

Математическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики в среде пакета программ StatGraphics; достоверность различий оценивали при помощи непараметрического критерия U (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни) (Коросов, Горбач, 2007).

Результаты и обсуждение

Накопление металлов в органах рыб

Стронций – наиболее интенсивно аккумулирующийся в тканях-мишенях рыб тяжелый металл из состава загрязнителей оз. Ковдор (табл. 2).

Таблица 3. Содержание Sr в органах рыб (мкг/г⁻¹ сухого веса) из оз. Ковдор (по данным Кашулин, 1999; Королева, 2001)

	Сиг	Ряпушка
Печень	2,6	5,0
Почка	10,9	6,3
Мышцы	15,1	13,9
Жабры	412	283
Скелет	1243	767

Обнаружение кальпаинов в органах рыб

Для разделения кальпаинов, имеющих незначительные отличия по молекулярной массе, и их ингибитора кальпастина проводили фракционирование цитозольной фракции тканей рыб при помощи гель-фильтрации на Сефакриле S300 в буфере, содержащем хелатор двухвалентных катионов ЭДТА. Общепринятыми методами тестирования активности кальпаинов во фракциях белкового элюента тканей рыб с молекулярными массами 120, 110 и 80 кДа (условно обозначаемых А, В и С) была обнаружена Ca²⁺-зависимая казеинолитическая активность. Ферменты указанных фракций проявляют каталитическую активность *in vitro* в присутствии 120 мкМ (фракция А), 1,5 мМ (фракция В) и 1,0 мМ (фракция С) ионов кальция. Соотношение активностей в разных фракциях фермента имеет органную специфичность. Данные гель-фильтрации образцов с последующим электрофоре-

зом в ПААГ с ДСН свидетельствуют о том, что протеиназы фракций А и В состоят из двух различных субъединиц с молекулярными массами приблизительно 80 и 27 кДа, то есть в нативном состоянии имеют структуру гетеродимеров, фракция С включает смесь двух полипептидов с молекулярными массами близкими 80 кДа. По совокупности экспериментальных данных (димерная структура, молекулярная масса субъединиц, чувствительность к кальцию) можно отнести протеиназу фракции А к гомологам μ -кальпаина человека, протеиназу фракции В – к гомологам m -кальпаина человека, а пик С, предположительно, является смесью их каталитических субъединиц.

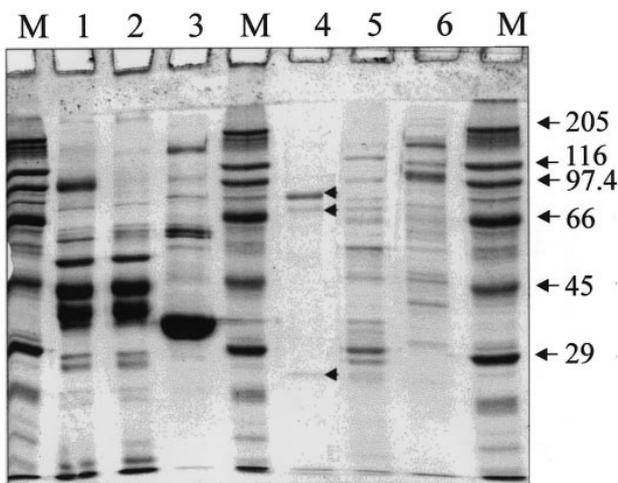


Рис. 1. ПААГ-электрофореграммы препаратов кальпаинов и кальпастина из мышц сига

Дорожка 1 – грубый экстракт; 2 – кальпастин-содержащая фракция; 3 – активная кальпаин-содержащая фракция; далее – фракции после деления на колонке с сефакрилом S300: 4 – С-фракция кальпаина; 5 – В-фракция кальпаина; 6 – А-фракция кальпаина; М – маркеры (подписаны справа): миозин 205 кДа; β -галактозидаза 116 кДа; фосфорилаза b 97,4 кДа; бычий альбумин 66 кДа; овальбумин 45 кДа; карбангидраза 29 кДа.

Выделенные ферменты оказались чувствительны к групповым ингибиторам цистеиновых протеиназ (лейпептину, E64) и агентам, алкилирующим SH-группы (йодоацетату, N-этилmaleимиду, Hg^{2+}), но не к ингибиторам протеиназ других типов (пепстатину, PMSF); кроме того, активность протеаз всех трех выделенных фракций угнеталась в присутствии кальпастин-содержащей фракции (170 кДа). Чувствительность к ингибиторам, абсолютная потребность в ионах кальция для проявления протеолитической активности и нейтральный pH оптимум позволили однозначно отнести изучаемые ферменты к цис-

теиновым протеазам (клан SA) семейства кальпаинов C2 согласно современной классификации протеолитических ферментов (Rawlings et al., 2010).

Сходство выделенных ферментов рыб с классическими μ - и m -кальпаинами млекопитающих подтверждается также данными о термостабильности ферментов; так, предполагаемый гомолог m -кальпаина (фракция В) утрачивает более 50% активности при прогревании препарата при 58 °С в течение 5 мин., в то время как фракции А и С более термостабильны. Указанный температурный критерий ранее предложен японскими исследователями (Toyohara et al., 1985) для различения форм кальпаинов млекопитающих.

Подтверждено присутствие в тканях рыб эндогенного ингибитора кальпаинов – кальпастина, который соэлюируется с колонки сефакрила S300 с белковой фракцией 170 кДа и обладает ингибирующим действием на фракции фермента А и В. Поскольку оценка молекулярного веса кальпастина проводилась методом эксклюзионной хроматографии с использованием в качестве стандартов сферических молекул белков, то молекулярный вес кальпастина, имеющего конфигурацию спирали (Goll et al., 2003), по всей вероятности, значительно завышен. Действительно, на ПААГ-электрофореграмме препарата кальпастина выявляется смесь полипептидов, молекулярные массы которых значительно ниже тех, что обнаруживаются с помощью гель-фильтрации – от 17 до 53 кДа, что согласуется с данными М. Сэлем с сотрудниками (Salem et al., 2005) о кальпастинах из *O. mykiss* и *D. rerio*. Ингибирующая активность кальпастин-содержащей фракции (170 кДа) из тканей рыб сохранялась при ее прогревании при 100 °С в течение 20 мин, что подтверждает высокую термостабильность ингибитора, также свойственную кальпастинам из других источников.

Таким образом, из тканей рыб были выделены гомологи двух форм кальпаинов, характеризующихся широкой тканевой экспрессией и универсальных для всех позвоночных животных, так называемых «повсеместных» кальпаинов – μ -кальпаина и m -кальпаина. Указанные протеазы имеют гетеродимерную организацию и состоят из каталитической 80 кДа (уникальной для каждой формы) и регуляторной 28 кДа субъединиц; в процессе очистки ферменты частично подвергаются диссоциации. Тканеспецифичные формы кальпаинов, характерные для млекопитающих, у рыб обнаружены не были;

информация о них также отсутствует в литературе. Кроме того, из тканей рыб была выделена кальпастин-содержащая белковая фракция, обладающая ингибирующей активностью по отношению к ферментам фракций А и В (гетеродимерам).

Функциональная активность кальпаин-кальпастиновой системы в органах рыб в присутствии Sr²⁺

Показаны отличия в активности внутриклеточных Ca²⁺-зависимых протеаз во всех изученных органах сигов из оз. Нижняя Пиренга и Ковдор (табл. 4). Характерно, что в мышцах, печени и жабрах рыб из загрязненного озера наблюдается снижение активности кальпаинов. Снижение данного показателя белкового обмена наиболее значительно при расчете удельной активности (то есть в пересчете на концентрацию тканевых белков). Известно, что одним из механизмов токсического действия Sr²⁺ является его конкуренция с двухвалентными катионами. В литературе описан ряд ситуаций, когда Sr²⁺ действует как аналог Ca²⁺ во внутриклеточных про-

цессах, например, он способен активировать Ca²⁺-зависимые K⁺-каналы примерно на 1/4 от эффективности Ca²⁺. Вытеснение кальция стронцием из Ca²⁺-связывающих белков, в том числе Ca²⁺-зависимых протеаз, при наличии у Sr способности к активации кальпаинов – вероятное объяснение наблюдаемого частичного подавления активности кальпаинов. Закономерным исключением являются биохимические изменения, происходящие при действии стронция в гонадах рыб. Вследствие ежегодного обновления этой ткани, накопление тяжелых металлов в гонадах незначительно. Интересно, что в этом случае наблюдается активация кальпаинов, характерная для развития адаптивных перестроек в тканях при действии различных токсикантов. Подобное увеличение общей активности кальпаинов наблюдалось в жабрах и мышцах окуня, *Perca fluviatilis*, из водоемов Карелии с повышенным содержанием ртути (Немова и др., 2001; Бондарева, 2004) и у бокоплавов и мидий из загрязненных участков Кандалакшской губы Белого моря (Бондарева, 2004; Бондарева и др., 2005).

Таблица 4. Активность кальпаинов (ЕА) в тканях самцов сига из оз. Ниж. Пиренга (контроль)/Ковдор (опыт)

Орган	Ca ²⁺ -зависимая казеинолитическая активность, ЕА					Белок, мг/мл
	Фракция А	Фракция В	Фракция С	Суммарная	Удельная	
мышцы	0,180	0,140	0,040	0,360	0,026	13,8
	0,185	0,140	0,045	0,365	0,023	16,2
жабры	0,500	0,125	1,50	2,125	0,343	6,2
	0,620	0,580	0,02	1,200	0,162	7,4
печень	0,405	0,100	0,085	0,590	0,046	12,8
	0,270	0,050	0,015	0,335	0,020	16,8
гонады	0,080	0,070	0,065	0,215	0,034	6,3
	0,035	0,160	0,045	0,240	0,042	5,7

Наиболее высокие физиологические значения активности кальпаинов обнаружены в жабрах (табл. 4), при этом для жаберного аппарата рыб из загрязненного озера характерно наиболее выраженное подавление активности кальпаинов по сравнению с изменениями в других органах; по-видимому, это связано с барьерной функцией жабр, испытывающих активное воздействие токсичных компонентов среды. Выявленное снижение функциональной активности кальпаинов – ферментов не только деградации белков, но и внутриклеточных регуляторов – по всей видимости, приводит к подавлению кальпаин-зависимых клеточных процессов (передачи импульсов, формирования скелетных мышц, апоптотического пути гибели клеток и других), что, несомненно, отражается на процессах жизнедеятельности организма.

Механизмы регуляции активности кальпаинов, изменяемые в присутствии Sr²⁺

Механизмы регуляции активности кальпаинов достаточно сложны и не до конца изучены, хотя известно, что присутствие Ca²⁺ необходимо на следующих этапах их функционирования: 1) связывание протеаз с внутриклеточными элементами, 2) конформационный переход с образованием каталитически активного кальпаина (активация), 3) автолиз, 4) диссоциация субъединиц и 5) связывание со специфичным эндогенным ингибитором, кальпастином.

В функционировании кальпаинов в клетках остается неразрешенным ряд вопросов. Основной из них – очень высокая потребность в Ca²⁺ (в миллимолярной области) для активации кальпаинов, в то время, как в живых клетках

обнаруживается миллимолярный его уровень. Один из возможных механизмов снижения потребности в кальции – связывание кальпаинов с биомембранами, осуществляемое за счет малой субъединицы. Также известно, что автолизированным кальпаинам требуются значительно более низкие концентрации кальция для активации, сравнимые с присутствующими в живых клетках. Ряд авторов, однако, утверждают, что активация кальпаинов не зависит от автолиза, и неавтолизированные кальпаины обладают высокой протеолитической активностью. Автолиз изучаемых протеаз заключается в отщеплении *N*-концевых фрагментов их 28 кДа и 80 кДа субъединиц и происходит при концентрации Ca^{2+} , несколько более высокой, чем необходима для проявления их протеолитической активности. Пока неясно, является ли автолиз необходимым этапом для инициации протеолитической активности кальпаинов, так как известно, что пропептиды его субъединиц не блокируют стерически активный центр. Эффект автокаталитического расщепления на потребность ферментов рыб в Ca^{2+} еще не установлен. Результаты автолиза детектировали методом ПААГ-электрофореза с ДСН. Субъединица 80 кДа быстро автокаталитически деградирует с образованием двух полос (73 и 69 кДа), которые можно выявить только в течение очень короткого времени с начала автолиза. У других организмов обычно продукты автолиза имеют молекулярные массы 78 и 76 кДа. Выявляются также три основные полосы (59, 43 и 28 кДа) и минорные полосы промежуточных молекулярных масс. Малая субъединица (24 кДа) деградирует с образованием трех фрагментов: 22, 19,3 и 17,8 кДа, их принадлежность к малой субъединице доказана при помощи иммуноблоттинга с антисывороткой против малой субъединицы. Ladrat с сотр. (2002) использовали в качестве активаторов кальпаина морского окуня 5 мМ Ca^{2+} или 8 мМ Sr^{2+} , при этом продукты автолиза фермента качественно не различались. Эти результаты подтверждают аналогичную роль Sr^{2+} и Ca^{2+} как индукторов автолиза кальпаинов со структурной точки зрения. Также детально изучен автолиз *m*-кальпаина из скелетных мышц лягушки в присутствии различных двухвалентных катионов (Sargianos et al., 1995). Полосы белковых фрагментов, обладающих различной электрофоретической подвижностью, оказались сходными при обработке любым из изученных металлов, различалась лишь степень гидролиза.

В изученных тканях рыб была зафиксирована активность, проявляемая изолированными 80 кДа субъединицами кальпаинов. Это согласуется с данными многих недавних исследований, четко показавших наличие в клетках активности каталитических полипептидов 80 кДа. Диссоциация гетеродимерных кальпаинов – также Ca^{2+} -опосредуемый процесс. В тканях рыб из озера Ковдор («опыт») отмечалось снижение протеолитической активности субъединиц 80 кДа; исключение составляют скелетные мышцы, для которых из-за особенностей физиологии характерно высокое содержание Ca^{2+} .

При возрастании во внутриклеточной среде содержания ионизированного кальция или его структурного аналога, катиона Sr, комплекс кальпаин-кальпаастатин распадается, и кальпаин выходит из-под контроля своего ингибитора и вызывает усиленную деградацию кальпаин-чувствительных белков.

Так, результаты нашего исследования и данные литературы свидетельствуют о том, что в присутствии Sr^{2+} изменяются все регуляторные этапы, обеспечивающие нормальное функционирование внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы, а именно, автолиз, активация, диссоциация и ингибирование.

В подтверждение наших выводов о способе взаимодействия Sr и Ca^{2+} как регуляторов процессов на молекулярном уровне был проведен эксперимент *in vitro* с использованием полученных препаратов кальпаинов рыб. Была протестирована способность различных двух- и трехвалентных катионов (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) активировать кальпаины (ионы добавлялись в концентрации 2,5 мМ в составе хлоридов). Как и ожидалось, Ca^{2+} – наиболее эффективный активатор кальпаинов (его эффективность принята за 100%) (рис. 2). Однако, и в присутствии Sr^{2+} ферменты активируются до 66% от уровня активности, индуцируемого Ca^{2+} . Значение максимальной каталитической активности кальпаинов при использовании этих катионов сходно и составляет $0,110 \pm 0,0085$ ЕА (для его достижения потребовались концентрации 2,2 мМ Ca^{2+} и 5,9 мМ Sr^{2+}). Ранее уже была показана способность Sr^{2+} и Ba^{2+} к активации кальпаинов из разных источников (рыб, осьминога, водных грибов) (Taneda et al., 1983; Yoshimura et al., 1983; Ojha, Wallace, 1988; Toyohara, Makinodan, 1989; Hatzizisis et al., 1996), однако, они действуют в этом качестве с меньшей эффективностью, чем Ca^{2+} .

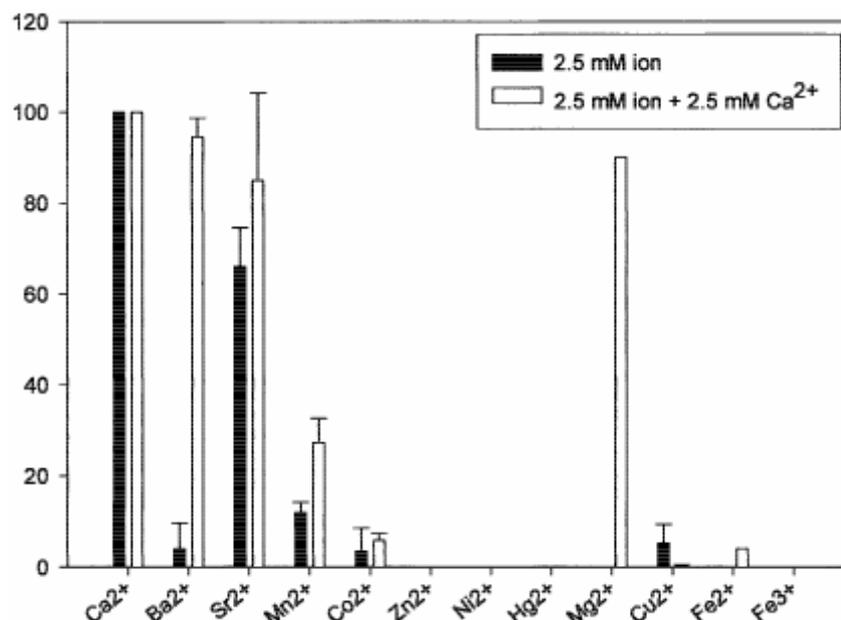


Рис. 2. Эффект различных катионов на кальпаин фракции В из мышц сига

Ca²⁺-индуцированная активность принята за 100%. Показана относительная казеинолитическая активность кальпаина как в присутствии индивидуального катиона (2,5 мМ), так и при совместном добавлении изучаемого катиона и Ca²⁺.

Эффект действия других двух- и трехвалентных катионов варьирует от слабой активации до полного ингибирования. В некоторых случаях слабая (менее 10% от Ca²⁺-индуцированной) активация кальпаинов обнаруживалась в присутствии Mn²⁺ (Edmunds et al., 1991), а также Ba²⁺, Co²⁺ и Cu²⁺. Такие катионы, как Zn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ и Fe³⁺ неэффективны для активации кальпаинов в изученной концентрации (2,5 мМ). Выраженное снижение Ca²⁺-индуцированной активности вызывают Mn²⁺, Co²⁺ и Fe²⁺. Полное ингибирование – Zn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺ и Fe³⁺. Mg²⁺ не обладает самостоятельным действием на кальпаины и не изменяет их активацию Ca²⁺.

Ионы Hg²⁺ полностью угнетают активность кальпаинов *in vitro*, сходный эффект также наблюдался *in situ* у рыб при изучении закисленных и загрязненных ртутью озер (Немова и др., 2001). Сходство наблюдаемых эффектов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* позволяет в определенной степени переносить результаты экспериментов *in vitro* в натурные исследования для объяснения эффектов организменного уровня.

Особенности биологического действия Sr²⁺

Известно, что Sr²⁺ токсичен для человека в той же степени, что и Ba²⁺. Есть эксперимен-

тальные данные о том, что Sr²⁺ действует как аналог Ca²⁺ во многих внутриклеточных процессах. Указанные катионы – Ca²⁺, Sr²⁺ и Ba²⁺ – члены одной группы элементов периодической системы, что предполагает не только определенные черты структурного сходства, но и, как показали наши эксперименты, сходство в механизмах взаимодействия с биомолекулами. Так, они способны активировать кальпаины, выделенные из разных организмов. Индивидуальное действие этих катионов на кальпаины на разных этапах их функционирования, а также взаимодействие катионов друг с другом еще не изучены в полной мере, однако, можно предположить, что они могут оказывать сопряженное действие, ослабляя или усиливая действие партнера, аналогично их роли активаторов кальпаинов *in vitro*. Относительное содержание ионов Ca²⁺ и Sr²⁺ в живых клетках не всегда технически возможно установить; но оценка физиологических реакций на поступление трэйс-элемента и других двухвалентных ионов помогает существенно дополнить сведения о химизме изучаемой металл-зависимой ферментной системы.

Следует отметить, что ответные реакции рыб на загрязнение оценивали комплексно, по ряду параметров. О нарушениях в метаболизме рыб, особенно сегов, из загрязненного водоема, наряду со снижением протеолитических процессов в цитозоле, свидетельствуют изменения других биохимических параметров клеточного метаболизма, изученных в нашей лаборатории, а также показатели популяционного неблагополучия

указанных видов. В условиях хронического загрязнения популяции сига и ряпушки имеют повышенное жиронакопление по сравнению с практически чистыми районами. Сравнительный анализ активности ферментов белкового, углеводного обмена и уровня активности одного из основных ферментов метаболизма ксенобиотиков – цитохрома P-450 показал, что защитные возможности метаболизма у сигов из оз. Ковдор резко снижены (Морозов и др., 2007; Нефедова и др., 2007). Биохимический статус ряпушки из оз. Ковдор, загрязненного отходами металлургического производства, сравнивали не только с состоянием рыб из оз. Ниж. Пиренга, но также с ряпушкой из оз. Сямозеро (также относительно чистого водоема Карелии); в обоих случаях по показателям соотношения фракций триацилглицерина / фосфолипиды (в том числе фосфатидилхолин и сфингомиелин), содержания коллагена, активности коллагеназы и некоторых других можно сделать заключение о негативных изменениях в метаболизме рыб из загрязненного водоема, которые могут, прежде всего, отразиться на воспроизводстве рыб.

Отсутствие старших возрастных групп сигов в загрязненном водоеме – показатель неблагоприятной экологической ситуации, поскольку для природной структуры данного вида в незагрязненных озерах характерно преобладание возрастных групп 7+, 8+, 9+ (Крогиус, 1926). Подобная тенденция к омоложению стада наблюдалась в условиях токсичной нагрузки и в других водоемах Кольского полуострова (например, оз. Имандра). Возраст репродуктивной зрелости сигов в загрязненном водоеме наступает при экстремально малых для данного вида размерах – малотычинковые сиги созревают в возрасте 3+ при длине тела 23 см, многотычинковые – 1+, 9,5 см (Шарова, 1999), что для водоемов Кольского Севера считается ранним, как правило, в северных озерах сиги созревают в возрасте пяти, а чаще 6–7 лет. Предполагается,

что раннее созревание наступает при напряженных условиях существования и часто связывается с неблагоприятной экологической обстановкой (Решетников, 1980; Моисеенко, 1997).

Выводы

1. Анализ содержания тяжелых металлов в органах сиговых рыб из загрязненного оз. Ковдор выявил преимущественное накопление стронция в скелетных элементах в сравнении с паренхиматозными органами. Уровень содержания стронция в костной ткани рыб является показательным при данном типе загрязнения водоемов и может быть использован в мониторинговых исследованиях.

2. У организмов, в органах которых аккумулируется Sr^{2+} , изменяются все регуляторные этапы, обеспечивающие нормальное функционирование внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы, а именно, автолиз, активация, диссоциация и ингибирование.

3. Снижение общей протеолитической способности кальпаинов можно расценивать как неблагоприятный прогностический признак, свидетельствующий о неблагополучии на организменном уровне.

4. По комплексу параметров клеточного обмена и популяционных показателей ряпушка признана более устойчивым видом к загрязнителям оз. Ковдор.

5. Функциональные показатели внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы позволяют предложить их в качестве дополнительного биотеста при оценке качества водоемов по состоянию обитающих в них рыб.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты № № 08-04-01140, 09-04-90733), Президента РФ НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

Бондарева Л. А. Влияние некоторых факторов среды на внутриклеточный протеолиз у гидробионтов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2004. 24 с.

Бондарева Л. А. Ca^{2+} -активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. 2002. Т. 4. № 1. С. 52–57.

Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвярайнен Е. И., Крупнова М. Ю., Шкляревич Г. А. Влияние загрязне-

ния прибрежной акватории Белого моря на внутриклеточный протеолиз у бентосных беспозвоночных // Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря: мат. IX международ. конф. Петрозаводск, 6–9 сентября 2004. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2005. С. 55–61.

Брень Н. В. Использование беспозвоночных для мониторинга загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами // Гидробиол. журнал. 1999. Т. 35. № 4. С. 75–88.

- Кашулин Н. А. Ответные реакции сига *Coregonus lavaretus* (L.) на загрязнение тяжелыми металлами // Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова восточной Фенноскандии: материалы междунар. конф. Петрозаводск, 6–10 сент. 1999 г. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. С. 132–133.
- Королева И. М. Влияние загрязнения на морфофизиологические показатели сигов (*Coregonus lavaretus*) в водоемах Кольского Севера. Автореф. дис. ... канд. биол. наук, Петрозаводск, 2001. 27 с.
- Коросов А. В., Горбач В. В. Компьютерная обработка биологических данных. Петрозаводск, 2007.
- Крогиус Ф. В. Ихтиологические работы на оз. Имандра // В кн. Работы Мурманской биологической станции. 2. 1926. С. 150–152.
- Моисеенко Т. И. Теоретические основы нормирования антропогенных нагрузок на водоемы Субарктики. Апатиты, 1997. 261 с.
- Морозов Д. Н., Высоцкая Р. У., Немова Н. Н., Кашулин Н. А. Активность цитохрома P-450 у сига *Coregonus lavaretus* и щуки *Esox lucius* из водоемов Субарктики при воздействии сточных вод горно-перерабатывающих предприятий // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 101–106.
- Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И., Крупнова М. Ю., Бондарева Л. А., Тойвонен Л. В., Комов В. Т. Активность внутриклеточных протеолитических ферментов в тканях речного окуня *Perca fluviatilis* с различным содержанием ртути // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. № 5. С. 704–707.
- Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Немова Н. Н., Шарова Ю. Н. Особенности состава тканевых липидов сигов (*Coregonus lavaretus* L.), обитающих в водоемах с разной антропогенной нагрузкой // Вопр. ихтиологии. 2007. Т. 47. № 1. С. 107–112.
- Попов П. А., Андросова Н. В., Аношин Г. Н. Накопление и распределение тяжелых и переходных металлов в рыбах Новосибирского водохранилища // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42. № 2. С. 264–270.
- Решетников Ю. С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 300 с.
- Шарова Ю. Н. Особенности функционирования репродуктивной системы сига (*Coregonus lavaretus* L.) субарктических водоемов // Биологические основы изучения, освоения и охраны животного и растительного мира, почвенного покрова восточной Фенноскандии: материалы междунар. конф. Петрозаводск, 6–10 сент. 1999 г. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. С. 172.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976, 72: 248–254.
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system // Physiol. Rev. 2003. V. 83. N 3. P. 731–801.
- Hames B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Hames B.D. and Rickwood D. (eds.). Oxford, U.K.: IRL Press, 1990. Pp. 1–147.
- Hatzizisis D., Gaitanaki C., Beis I.S. Purification and properties of a calpain II-like proteinase from *Octopus vulgaris* arm muscle // Comp. Biochem. Physiol. 1996. V. 113B. N 2. P. 295–303.
- Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noel J.I., and Fleurence J. Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: Polymorphism and biochemistry studies // Comp. Biochem. Physiol. 2000. V. 125 B. P. 83–95
- Ladrat C., Verrez-Bagnis V., Noel J.I., Fleurence J. Milli-calpain from Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) white muscle: purification, characterization of its activity and activation *in vitro* // Mar. Biotechnol. (NY). 2002. V 4. N 1. P. 51–62.
- Laemmli U.K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y., Tanaka K. A quantitative distribution study on calpain and calpastatin in rat tissues and cells // Biochem. Int. 1981. V. 2. N 6. P. 651–656.
- Ojha M., Wallace C.J.A. Novel Ca²⁺-activated neutral protease from an aquatic fungus, *Allomyces arbuscula* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. P. 1254–1260.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. and Bateman A. MEROPS: the peptidase database // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38. P. D227–D233.
- Salem M., Yao J., Rexroad C.E., Kenney P.B., Semmens K., Killefer J., Nath J. Characterization of calpastatin gene in fish: Its potential role in muscle growth and fillet quality // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 141. N 4. P. 488–497.
- Sargianos N., Gaitanaki C., Beis I. Studies on the autolysis of m-calpain from the skeletal muscle of the amphibian *Rana ridibunda* // J. Exp. Zool. 1995. V. 271. P. 82–94.
- Taneda T., Watanabe T., Seki N. Purification and some properties of a calpain from carp muscle // Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 1983. V. 49. N 2. P. 219–228.
- Toyohara H., Makinodan Y., and Ikeda S. Detection and some properties of calpain II (high-Ca²⁺-requiring form of calpain) from carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes // Comp. Biochem. Physiol. 1985. 81B, 583–586.
- Toyohara H., Makinodan Y. Comparison of calpain I and calpain II from carp muscle // Comp. Biochem. Physiol. 1989. V. 92B. N 3. P. 577–581.
- Yoshimura N., Kikuchi T., Sasaki T., Kitahara A., Hatanaka M., Murachi T. Two distinct Ca²⁺ proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. N 14. P. 8883–8889.
- Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F., and Goll D.E. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1077. P. 197–208.

THE EFFECT OF Sr^{2+} ON INTRACELLULAR Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEASES IN FISH

L.A. Lysenko¹, N.P. Kantserova¹, E.I. Kaivarainen¹, N.N. Nemova¹, N.A. Kashulin²

¹ Institute of Biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru

² Institute of North Industrial Ecology Problems, Kola Science Centre Russian Academy of Science, Apatity,
Murmansk region, Russia

The release of strontium (Sr) to the environment is of concern due to the strong accumulation of this calcium resembling element in the bone and other tissues. The uptake of Sr^{2+} in the whitefish, *Coregonus lavaretus* and *Coregonus albula*, was studied in chemically defined freshwater lakes in Northwestern Russia including highly contaminated by Sr^{2+} Coudor Lake. The accumulation rate of Sr^{2+} in fish tissues is strongly correlated with the activity of Ca^{2+} -dependent proteases, calpains. This effect is attributed to the Sr^{2+} resembling capacity in the relation to Ca^{2+} in calcium-binding proteins and can be suggested as a part of a complex mechanism of Sr^{2+} toxicity. Calpains, having both degradative and regulatory roles, are believed to participate in signal

transduction, skeletal muscle growth, and degenerative disease. The regulatory mechanisms governing calpain activity are complex and it is known that Ca^{2+} can be involved in cellular components binding, proteolytic activity, autolysis, dissociation, and calpastatin (specific calpain inhibitor) binding. It was shown that all indicated Ca^{2+} -dependent steps in calpain activity regulation are affected by Sr^{2+} uptake in the *in vivo* experiment. Sr^{2+} was found to activate fish calpains *in vitro* to 60% of Ca^{2+} activity. Our results show that Sr^{2+} can affect calpain activity in fish following diverse pathological features in cellular metabolism. Some population effects of extremely high Sr^{2+} accumulation in fish due to metallurgy industry sewage are discussed.

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У РЫБ

Л. А. Лысенко, Е. И. Кяйвярйнен, М. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук, Институт биологии Карельского научного центра РАН,
г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru

Высоко упорядоченная структурная организация сократительных волокон скелетных мышц обеспечивает способность к совершению быстрых и синхронных движений. В ряде случаев в ответ на действие токсикантов у рыб развивается характерное повреждение мышечной ткани, визуально проявляющееся как атрофия и расслоение волокон. Гистохимическим признаком этого нарушения является прогрессирующая потеря целостности Z-дисков саркомеров, а на биохимическом уровне наблюдается повышенный гидролиз миофибриллярных белков. Дегградация белков саркомеров осуществляется целой системой внутриклеточных протеиназ и экзопептидаз, локализованных в лизосомах и вне лизосом. Протеолиз в лизосомах, основными участниками которого являются катепсины В и D, в большей степени неселективен (Дин, 1981; Немова, 1996). Высокоселективный протеолиз в цитозоле осуществляется АТФ- и убиквитин-зависимыми протеазами, преимущественно мультисубъединичной 26S протеасомой (Hershko, Ciechanover, 1998), кальпаиновой системой, включающей Ca^{2+} -зависимые протеазы и их эндогенный ингибитор кальпаастатин (Goll et al., 2003) и другими, предположительно, АТФ-независимыми, протеазами. Установлено присутствие кальпаинов, протеасом и катепсинов в тканях изученных видов рыб (Немова, 1996; Бондарева, 2002), однако, данные о свойствах и физиологической роли указанных протеиназ у рыб ограничены.

Модель обмена миофибриллярных белков была разработана В. Дэйтоном с сотр. еще в 1975 году (Dayton et al., 1975). Соотношение роли кальпаинов и протеасомы в этом процессе обсуждается исследователями в течение длительного времени. Кальпаины не способны расщеплять основные сократительные белки миофибриллы актин и миозин, поэтому результатом

их действия является 1) прогрессивное разрушение Z-диска, приводящее, в конечном счете, к полной его потере; 2) последовательное высвобождение толстых филаментов миозина и тонких нитей актина с поверхности миофибриллы; 3) образование фрагментов титина (иногда величиной до 500 кДа), небулина, десмина и других кальпаин-чувствительных белков. В экспериментах показано, что ингибиторы кальпаинов, но не лизосомотропные агенты, предотвращают или снижают протеолитические процессы, характерные для патологии мышечной ткани, однако, нет оснований предполагать, то в них участвуют только кальпаины. Сайт-специфичность кальпаинов обуславливает необходимость участия других протеаз для дальнейшего расщепления крупных фрагментов титина, небулина, десмина, тропонина, тропомиозина и С-белка, а также актина и миозина. Вероятно, свободные молекулы актина, миозина и фрагменты перечисленных миофибриллярных белков подлежат убиквитинилированию, и в их дальнейшем расщеплении главная роль принадлежит протеасоме (Hershko, Ciechanover, 1998). С другой стороны, протеасома не может расщеплять интактные миофибриллы или цитоскелетные комплексы, по всей видимости, из-за того, что вход в центральную полость протеасомы (диаметр 1–1,3 нм), содержащую активные центры, слишком узок для проникновения миофибрилл (их диаметр 10–100 μ м). Степень убиквитинилирования субстратов считается скоростью-лимитирующим этапом протеасомной дегградации белков (Ordway et al., 2000). Поскольку экспрессия субъединиц протеасомы в атрофичных мышцах изменяется незначительно, можно предположить нарушение системы убиквитинилирования. Таким образом, усиленный гидролиз белков при миодистрофии требует синергичного участия, по крайней мере, двух протеолитиче-

ских систем; при этом высвобождение актиновых и миозиновых филаментов из миофибрилл осуществляют кальпаины, а расщепление свободных полипептидов и их фрагментов до аминокислот или коротких пептидов – протеасома (Dayton et al., 1975; Goll et al., 1991; et al., 2005), а также, возможно, непосредственно лизосомальные катепсины.

При миодистрофии повышается активность и экспрессия мРНК кальпаинов, усиливается деградация кальпастина (Goll et al., 2003; Nakamura et al., 1991). По этим признакам можно судить, что при миодистрофии увеличивается общая активность кальпаинов (отсутствие кальпастина также потенциально увеличивает их активность). Учитывая тот факт, что менее 10% кальпаина в миоцитах находится в активированном состоянии, не вполне понятно, зачем для повышения белковой деградации в мышцах необходим его избыточный синтез. Можно предположить, что «дополнительный» кальпаин нарушает нормальную регуляцию активности этих ферментов. И кальпаины, и протеасома присутствуют в скелетных мышцах в больших количествах (Ordway et al., 2000), следовательно, для усиления протеолитических процессов не обязательно повышение их синтеза, достаточны лишь изменения в регуляции активности этих двух протеолитических систем.

Характерным примером описанного феномена является патология мышечной ткани, обнаруженная у русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti*) при развитии заболевания, вспышка которого наблюдалась в волжско-каспийском бассейне в 1987 году. Поражение рыб субтоксическими дозами промышленных загрязнителей индуцировало рас-

слоение волокон скелетных мышц и разрушение Z-дисков саркомеров (Физиолого-биохимический статус, 1990). Первичная деструкция мышц была обусловлена активацией кальпаинов, при этом достоверное повышение их активности у пораженных рыб обнаруживалось не только в скелетных мышцах, но и в других органах, что подчеркивает генерализованный характер заболевания (Немова и др., 1992; Немова, 1996). В тканях также наблюдалась активация лизосомальных протеаз (катепсинов), необходимых для последующих этапов расщепления белков, освобожденных из состава миофибрилл кальпаинами.

Таким образом, пусковая роль в белковой деградации при повреждении мышечной ткани принадлежит кальпаинам, о чем свидетельствует состав продуктов протеолиза индивидуальных мышечных волокон, разрушение компонентов Z-дисков. Кроме того, токсическое действие веществ на тканевом уровне часто сопровождается явлением цитотоксичности, связанном с гибелью клеток путем некроза или апоптоза, а в этих процессах кальпаины также играют ключевую роль. Последующие этапы деградации белков, изолированных кальпаинами из структуры миофибрилл, до пептидов и аминокислот протекают при участии протеасомы и лизосомальных катепсинов и, следовательно, зависят от эффективности ферментов убиквитинилирования и скорости везикулообразования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (гранты № № 08-04-01140, 09-04-90733), Президента РФ НШ-306.2008.4 и НШ-3731.2010.4 и проекта Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

Литература

Бондарева Л. А. Са²⁺-активируемые протеолитические ферменты у рыб и водных беспозвоночных // Вестник молодых ученых. Сер. Науки о жизни. 2002. Т. 4. № 1. С. 52–57.

Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир, 1981. 120 с.

Немова Н. Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1996. 104 с.

Немова Н. Н., Сидоров В. С., Григорьева Л. И., Валуева Т. А., Мосолов В. В., Кяйвярайнен Е. И., Лукьяненко В. И. Внутриклеточные протеиназы в органах русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* при расслоении мышц // Вопр. ихтиологии. 1992. Т. 32. № 5. С. 57–62.

Физиолого-биохимический статус волго-каспийских осетровых в норме и при расслоении мышечной

ткани (кумулятивный политоксикоз). Отв. ред. Лукьяненко В. И. Рыбинск: Ин-т биологии внутр. вод АН СССР, 1990. 262 с.

Attaix D., Ventadour S., Codran A., Bechet D., Taillandier D., Combaret L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting // Essays Biochem. 2005. V. 41. P. 173–186.

Dayton W.R., Goll D.E., Stromer M.H., Reville W.J., Zeece M.G., Robson R.M. Some properties of a Ca²⁺-activated protease that may be involved in myofibrillar protein turnover. In: Proteases and Biological Control, ed. by Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab., 1975. P. 551–577.

Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system // Physiol. Rev. 2003. V. 83. N 3. P. 731–801.

Goll D.E., Dayton W.R., Singh I., Robson R.M. Studies of the α -actinin/actin interaction in the Z-disk by

using calpain // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 8501–8510.

Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. P. 425–479,

Nakamura M., Imajoh-Ohmi S., Suzuki K., Kawashima S. An endogenous inhibitor of calcium-

activated neutral protease in UMX 7.1 hamster dystrophy // Muscle Nerve. 1991. V. 14. P. 701–708.

Ordway G.A., Neuffer P.D., Chin E.R., DeMartino G.N. Chronic contractile activity upregulates the proteasome system in rabbit skeletal muscle // J. Appl. Physiol. 2000. V. 88. P. 1134–1141.

ROLE OF INTRACELLULAR PROTEASES IN MUSCLE TISSUE DAMAGE IN FISH

L.A. Lysenko, E.I. Kaivarainen,, M. Ю. Крупнова, Н. Н. Немова

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: l-lysenko@yandex.ru*

It was shown that calpains are key regulators of protein degradation in normal and damaged muscular tissue according to the composition of proteolytic products of individual muscular fibers and destruction of Z-disc components. Furthermore the effect of toxic substances at tissue level is often accompanied by the phenomenon of the cytotoxicity, related with cell death either by

necrosis or apoptosis, and it is known that calpains are mediated both processes. The subsequent stages of degradation of the proteins isolated from myofibrils by calpains up to peptides and amino acids proceed at participation of proteasome and lysosomal cathepsins and, hence, depend on efficiency of ubiquitinilating enzymes and vesicle formation rates.

СОДЕРЖАНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ, МАГНИЯ В ПОЗВОНКАХ И ЧЕШУЕ ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS L.* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД

А. С. Маврин, В. И. Мартемьянов

Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
пос. Борок, Ярославская обл., Россия,
e-mail: mavr_as@mail.ru

Введение

Катионы – натрий, калий, кальций, магний совместно с анионами – хлором, сульфатом и гидрокарбонатом являются основными компонентами минерального состава природных вод. Они входят в состав различных органов и тканей животных и растений, выполняя различные функции.

Одним из наиболее важных биоэлементов является кальций. У высших и низших позвоночных кальций участвует в формировании костного скелета растущего организма. Он входит в состав основного минерального компонента костной ткани – оксиапатита (Касавина, Торбенко, 1979). Заключительный этап полового созревания – вителлогенез, в процессе которого происходит синтез, и накопление желтка в ооцитах, происходит при участии кальция (Follet e.a., 1968).

Скелетное и половое развитие тесно взаимосвязаны. Наступление половой зрелости находится в прямой зависимости от зрелости костной ткани, определяемое ее минеральной плотностью (МПКТ) (Хрисанфова, Перевозчиков, 2002).

Непрерывность существования различных видов живых организмов зависит от состояния их среды обитания и успеха воспроизводства. Изучение закономерностей полового созревания рыб и реализации их различных жизненных стратегий связано со знанием процессов ионной регуляции у гидробионтов (Виноградов, 2000) и периодизацией индивидуального развития рыб (Шатуновский, 1998, 2001).

Для изучения индивидуального развития рыб используют прямое наблюдение, а также ретроспективное восстановление картины роста рыб за прошедший период времени с применением различных регистрирующих структур. В обобщающих работах отмечается что, чешуя рыб является

полифункциональной, диагностической и регистрирующей структурой (Бурдак, 1979; Мина, Клевезаль, 1970; Дгебуадзе, Чернова, 2009). На ширине межсклеритных и межкошцевых зон роста чешуи отражаются, как внешние условия жизни (Лапин, 1965; Ваганов, 1978; Касьянов, Сметанин, 1981; Бугаев, 1986), так и физиологические перестройки, вызванные нерестом (Замахаяев, 1940; Menon, 1953; Garrud, Newell, 1958; Чугунова, 1959; Липская, Овен, 1970). В связи с этим, образование широких и узких межкошцевых зон на чешуе может быть использовано для понимания закономерностей индивидуального развития и полового созревания рыб.

В процессе роста и полового созревания организм нуждается в поступлении различных элементов, включая ионы, из внешней среды. Поступление необходимых биоэлементов в растущий организм наземных животных происходит двумя путями – с пищей и водой. У рыб поступление ионов осуществляется в основном из воды через жабры (Krogh, 1939, Fleming, 1968; Simkiss, 1973; Виноградов, 2000).

Ранее было показано, что внешние условия влияют на рост, время достижения половой зрелости (Берг, 1937; Дмитриева, 1957; Кошелев, 1971) и ионный обмен между организмом рыб и водой (Виноградов, 2000). Между этими тремя интегральными показателями существует взаимная связь. Изменения ионного обмена влияют на содержание электролитов в различных тканях организма. В. В. Русановым (1979) была показана связь между внешними гидрохимическими условиями и содержанием ионов в костях и чешуе ювенильных рыб.

Остается неизвестным: имеется ли какая-либо взаимосвязь между зрелостью гонад и содержанием ионов в скелете и чешуе рыб?

Цель работы: Определить содержание ионов натрия, калия, кальция, магния в позвонках и чешуе у самок и самцов плотвы (*Rutilus rutilus* L.) в зависимости от зрелости гонад в преднерестовый период.

Материал и методы

Материалом для работы послужила плотва, пойманная в реке Ильдь (Некоузский район Ярославской области) в период с 9 марта по 3 апреля 2009 года.

У каждой особи измеряли длину тела от начала головы до конца чешуйного покрова с помощью штангенциркуля (точность 0,1 мм) и массу тела с помощью весов ВЛКТ-500 (точность 0,01 г). Определяли пол и стадию зрелости гонад. Всего было исследовано 25 самок и 13 самцов.

Чешую для определения ширины межкольцевых зон брали в первом ряду над боковой линией в количестве 3-х штук с одной рыбы, фиксировали между двумя предметными стеклами и фотографировали с помощью цифровой фотокамеры Canon PS A720 IS через стереомикроскоп Technival Carl Zeiss. Обработка фотоматериалов для выделения колец на чешуе была проведена в графическом редакторе iPhoto plus v.1.1с. Графически выделяли только те кольца, которые прослеживались по всей окружности и имели при этом участки с выклинивающимися, разрушенными и слившимися склеритами в примыкающей к кольцу зоне роста. Эти кольца являются границами зон роста чешуи. Для контрольного определения колец использовали световой стереомикроскоп, поскольку при изменении направления подсветки, в результате преломления света проходящего сквозь чешую, увеличивалась четкость их отображения. Всего исследовано и проанализировано 75 фотоснимков чешуи.

Для снижения разнокачественности перед статистической обработкой была проведена биологическая дифференцировка собранного материала. Самки и самцы плотвы были разделены по зрелости гонад на 2 группы: незрелые – ювенильные с гонадами во II стадии зрелости и зрелые – находящиеся в репродуктивном состоянии с гонадами в IV стадии зрелости. Далее, на основе сопоставления размеров краевых и внутренних межкольцевых зон роста чешуи на полученных фотоснимках, и выбора наиболее типичного их расположения, учитывая эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза рыб (Шатуновский, 1998, 2001), самки первой группы были разделены на ювенильных и пропускаю-

щих нерест. Самки второй группы – на впервые созревших и повторно созревших.

Позвонки для определения содержания ионов брали из туловищного отдела позвоночника, чешую – в первом и втором рядах над боковой линией посередине тела.

Определение ионов в чешуе и позвонках проводили методом пламенной спектрофотометрии. Для этого чешую и позвонки средней массой около 100 мг растворяли в концентрированной азотной кислоте. Затем в каждую пробу добавляли дистиллированную воду с таким расчетом, чтобы получалось разведение в 200 раз. Концентрация ионов в чешуе и позвонках выражали в ммоль/кг сырой массы ткани. Связь между содержанием ионов в позвонках и чешуе определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

Статистическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2003, Quattro Pro 5.0, Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($X \pm m$), оценка достоверности проведена для уровня вероятности $P=0,05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

В результате проведенной биологической дифференцировки собранного материала было выделено 4 группы самок плотвы. Для каждой группы рыб были определены средние значения длины и массы тела. В таблице представлены средние значения размерно-массовых характеристик самок и самцов плотвы.

Самки	Длина тела, см	Масса тела, г	n
Ювенильные	11,3 ± 0,2	24,0 ± 1,5	7
Впервые созревшие	10,7 ± 0,2	20,3 ± 1,7	4
Пропускающие нерест	11,3 ± 0,3	24,9 ± 1,9	6
Повторно созревшие	12,1 ± 0,3	30,7 ± 2,4	8
Самцы	Длина тела, см	Масса, г	n
Ювенильные	9,8 ± 0,63	15,6 ± 2,6	4
Половозрелые	10,2 ± 0,2	20,4 ± 1,6	9

По размерно-массовым характеристикам ювенильные, впервые созревшие и пропускающие нерест достоверно не отличались. Повторно созревшие самки имели длину и массу тела больше, чем самки других групп. Ювенильные и зрелые самцы не имели достоверных различий по длине тела.

Графическая обработка чешуйного фотоматериала позволила установить некоторые общие закономерности расположения колец на чешуе плотвы из разных групп и представить их в виде обобщенных схематических данных на рисунке 1.

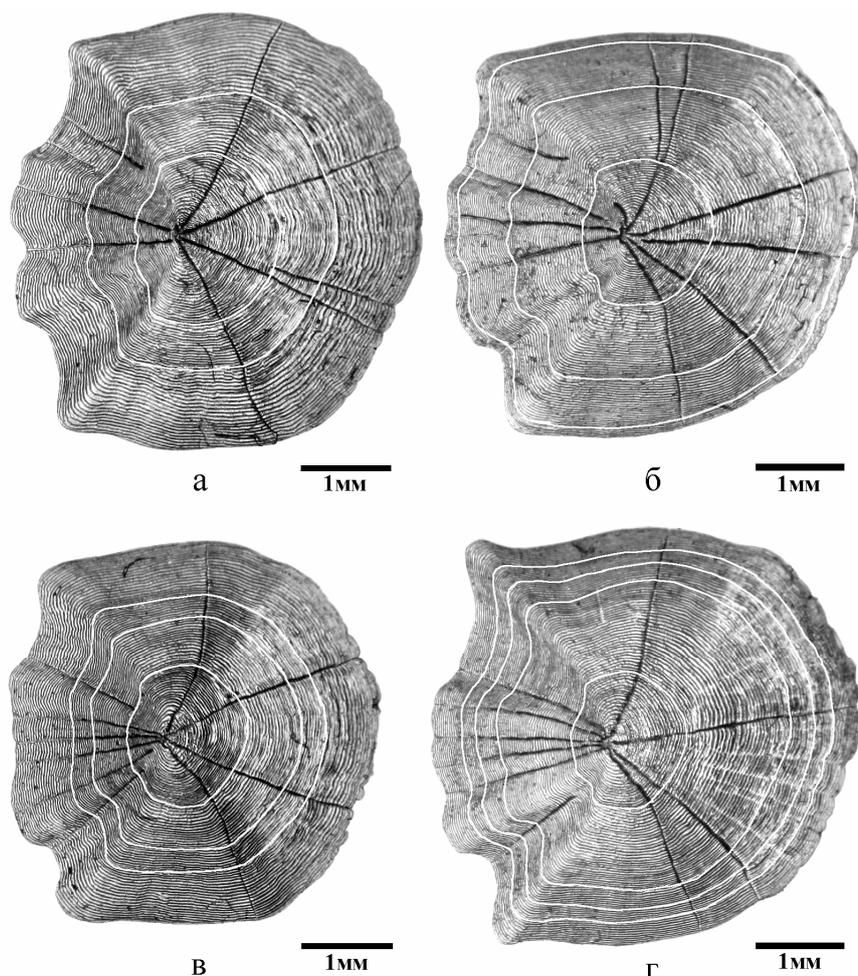


Рис. 1. Расположение колец на чешуе самок плотвы.

а – ювенильные, б – впервые созревшие, в – пропускающие нерест, г – повторно созревшие

На чешуе ювенильной плотвы сформированы три широких межкольцевых зоны, которые свидетельствуют об интенсивном соматическом росте (рис. 1а). В период ювенильного развития процессы дифференцировки и первичного роста половых клеток, не связаны со значительными затратами пластических и энергетических веществ. В это время с физиологической и биохимической точки зрения они не оказывают определяющего воздействия на обмен веществ (Шатуновский, 1998, 2001).

Чешуя впервые созревших самок имеет такие же три широких зоны роста, как у ювенильных и одну узкую краевую зону (рис. 1б). Это объясняется тем, что в период достижения половой зрелости происходит быстрое развитие и рост половых клеток. Генеративный обмен требует расхода значительной части ресурсов организма, тормозит процессы соматического роста (Шатуновский, 1998, 2001). Известно, что в год

достижения половой зрелости у большинства исследованных видов рыб снижается скорость линейного роста (Васнецов, 1934; Никольский, 1965).

Наиболее характерным отражением периода полового состояния на чешуе, является появление второй, третьей и следующих узких межкольцевых зон роста (рис. 1г). Начало этого периода связано с участием особей в процессе воспроизводства популяции. Процессы, протекающие в это время в организме, связаны со значительными тратами пластических и энергетических веществ на генеративный обмен и соматический рост (Шатуновский, 1998, 2001). Приросты длины тела в этот период, как правило, меньше, чем в ювенильный. Однако в некоторых случаях, когда рыбы пропускают нерест, наблюдается увеличение размера краевых зон роста чешуи (рис. 1в) и длины тела рыб. Очевидно, это происходит в результате того, что после последнего нереста в организме происходит

уменьшение общих ресурсов до значений ниже минимальных, снижаются пластические и энергетические траты на генеративный обмен. У таких самок плотвы гонады находятся во 2 стадии зрелости.

Исследования содержания ионов в тканях выделенных четырех групп самок и самцов в преднерестовый период показали, что по сравнению с чешуей, наиболее значимые различия наблюдались в позвонках (рис. 2).

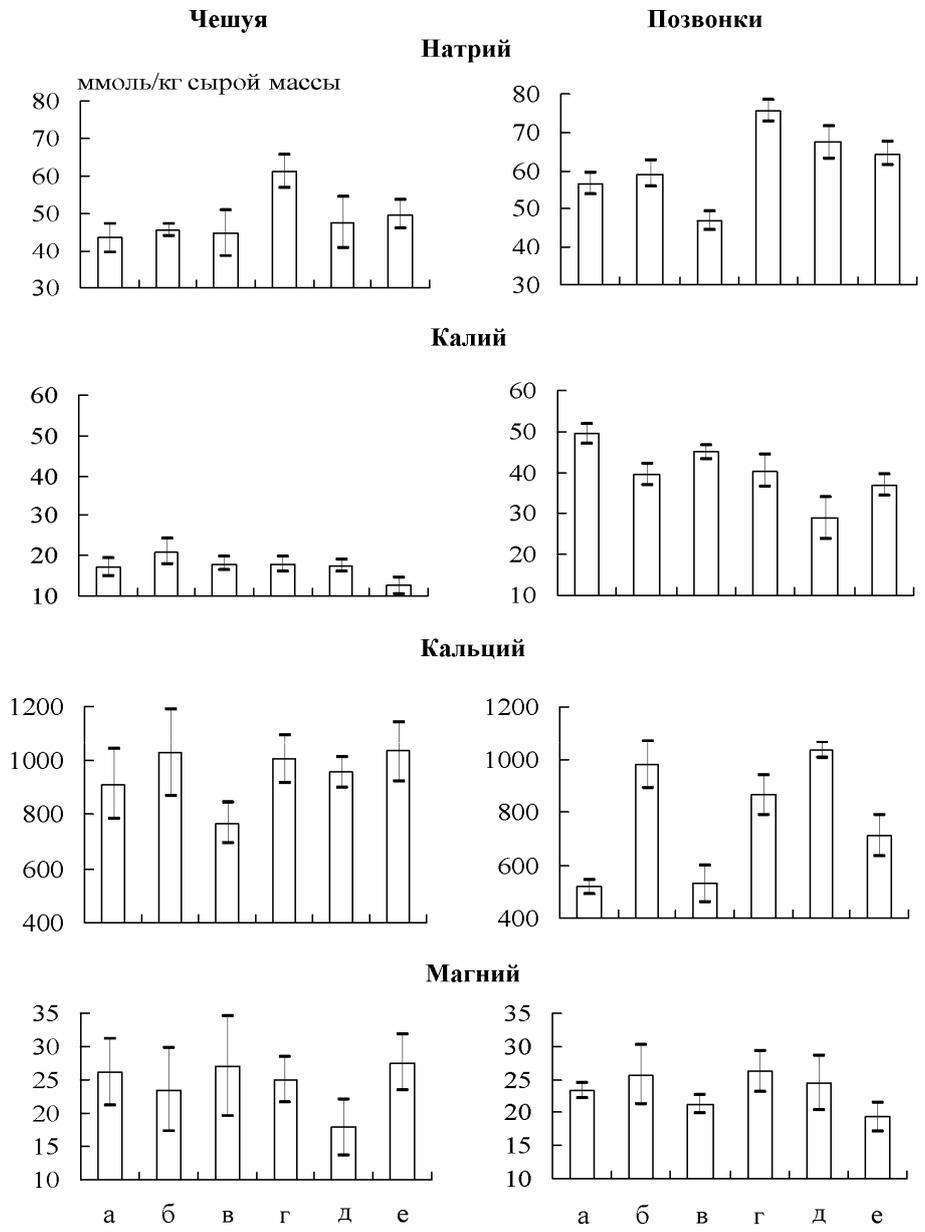


Рис. 2. Содержание катионов в чешуе и позвонках плотвы в преднерестовый период.

Самки плотвы: а – ювенильные, б – впервые созревшие, в – пропускающие нерест, г – повторно созревшие.
Самцы плотвы: д – ювенильные, е – созревшие.

Для позвонков характерна меньшая вариабельность содержания кальция и магния по сравнению с чешуей. Такая же закономерность была установлена по кальцию в работе В. В. Русанова (1979) для сеголеток и двухлеток карпа. Содержание двухвалентных ионов в позвонках и чешуе исследованных рыб изменялось в пределах Са – 450–1200

ммоль/кг, Mg – 13–35 ммоль/кг сырой массы костной ткани. Содержание одновалентных ионов в позвонках было выше (рис. 2 а,б,в,г,д,е – справа), чем в чешуе: натрия в 1,2–1,3 раза, калия в 2,2–2,5 раза (рис. 2 а,б,в,г,д,е – слева). Содержание кальция в чешуе зрелых самок и самцов (рис. 2 б,г,е – слева) было больше, чем в чешуе не зрелых (рис. 2 а,г,д –

слева). В позвонках рыб наблюдалась та же тенденция за исключением самцов. Содержание кальция в позвонках ювенильных самцов было больше, чем у половозрелых (рис. 2 д,е – справа).

Проведенный сравнительный анализ содержания кальция в позвонках и чешуе повторно созревших самок выявил их сильную положительную корреляционную связь $r=0,81$. Аналогичная связь наблюдалась у ювенильных самок плотвы в чешуе между содержанием Mg и Na ($r=0,96$), Mg и Ca ($r=0,79$). Следует отметить, что у пропускающих нерест самок плотвы наблюдалась сильная отрицательная связь между содержанием Ca и Mg в позвонках $r=-0,93$, K и Na в чешуе $r=-0,94$. У повторно созревших самок плотвы в чешуе установлена сильная положительная связь между содержанием Mg – Na ($r=-0,72$) и Mg – K ($r=-0,81$).

Содержание натрия в позвонках самок пропускающих нерест (рис 2 в) было достоверно меньше, а у повторно нерестящихся – больше (рис 2 г), чем у всех других групп.

Концентрация калия в позвонках ювенильных самок было больше, чем у впервые и повторно созревших (рис 2 а,б,г). Обратная зависимость наблюдалась у самцов (рис 2 д,е).

В позвонках впервые и повторно созревших самок (рис 2 а,б) содержание кальция было больше, чем у ювенильных и пропускающих нерест (рис 2 в,г). Мы полагаем, что повышенный уровень кальция в позвонках зрелых самок свидетельствует о более высокой способности организма поглощать эти ионы из воды и возможно из пищи. Содержание кальция в позвонках ювенильных самцов было выше, чем у половозрелых. Возможно, что в процессе их созревания происходит мобилизация кальция из позвонков.

По содержанию магния в чешуе и позвонках у всех исследованных групп рыб достоверных отличий обнаружено не было, однако прослеживалась тенденция аналогичная изменениям в содержании кальция.

Заключение

Биологическая дифференцировка собранного материала, проведенная на основе изучения закономерностей чередования широких и узких меж-

кольцевых зон роста на чешуе, позволила установить связь между рисунком на чешуе и зрелостью гонад. Благодаря этому было выделено 4 группы рыб, отличающихся зрелостью гонад: ювенильные, впервые созревшие, пропускающие нерест и повторно созревшие самки плотвы. Во всех выделенных нами группах данные по размерам межкольцевых зон роста хорошо согласуются с теоретическими данными М. И. Шатуновского (1998, 2001) по эколого-физиологическим характеристикам рыб в разные периоды онтогенеза.

Сравнение этих групп по содержанию ионов в позвонках и чешуе в преднерестовый период показало, что созрели те самки, в позвонках которых кальция накопилось не менее 700 ммоль/кг, натрия – 50 ммоль/кг, калия – 25 ммоль/кг, магния – 14 ммоль/кг сырой массы костной ткани. У самцов в процессе созревания концентрация кальция в позвонках снизилась до 710 ± 77 ммоль/кг, натрия – 64 ± 3 ммоль/кг, магния – 19 ± 2 ммоль/кг, а калия увеличилась до 37 ± 3 ммоль/кг сырой массы костной ткани.

Корреляционный анализ между содержанием ионов кальция в позвонках и чешуе повторно созревших самок показал тесную положительную связь. Ионы кальция и магния в чешуе ювенильных рыб связаны сильной положительной зависимостью, в то время как в позвонках рыб пропускающих нерест эта связь отрицательная. Содержание ионов калия в чешуе повторно созревших рыб положительно коррелирует с содержанием ионов натрия. Это свидетельствует об их связи в ионных обменных процессах. Оба эти иона участвуют в регуляции активности различных ферментов. Обратная зависимость наблюдается у самок пропускающих нерест. Содержание натрия в позвонках этих рыб низкое по сравнению с содержанием у ювенильных и созревших и составляет $47,0\pm 2,3$ ммоль/кг сырой массы костной ткани. Вероятно, изменения в соотношении ионов в костных структурах у самок пропускающих нерест свидетельствуют о дисбалансе основных ионов и нарушении процессов ионной регуляции.

Выражаем большую благодарность организаторам за великолепную подготовку и проведение конференции.

Литература

Берг Л. С. 1937. Новые данные по биологии лосося (*Salmo salar*). // Успехи соврем. биол., Т. 6. Вып. 1. С. 5–19.

Бугаев В. Ф. 1986. О дополнительных зонах на чешуе и особенностях линейного роста молоди нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) в бассейне

реки Камчатка. // *Вопр. ихтиол.* Т. 26. Вып. 1. С. 87–93.

Бурдак В. Д. 1979. *Функциональная морфология чешуйного покрова рыб.* Киев: Наукова думка. 164 с.

Ваганов Е. А. 1978. *Склеритограммы как метод анализа сезонного роста рыб.* Новосибирск: Наука, Сиб. отделение. 135 с.

Васнецов В. В. 1934. *Опыт сравнительного анализа линейного роста семейства карповых.* // *Зоол. журн.* Т. 13. № 3. С. 540–584.

Виноградов Г. А. 2000. *Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных.* Наука. 216 с.

Дгебуадзе Ю. Ю., Чернова О. Ф. 2009. *Чешуя костистых рыб как диагностическая и регистрирующая структура.* 315 с.

Дмитриева Е. Н. 1957. *Морфоэкологический анализ двух видов карася.* // *Труды Ин-та морф. животных АН СССР.* № 16. С. 102–170.

Замахаев Д. Ф. 1940. *Нерестовые марки на чешуе каспийских сельдей.* // *Материалы по биологии сельдей северного Каспия* Тр. ВНИРО. Т. 14. С. 3–20.

Касавина Б. С., Торбенко В. П. *Жизнь костной ткани.* 2-е изд. 1979. М.: Наука. 176 с.

Касьянов А. Н., Сметанин М. М. 1981. *К анализу склеритных рядов чешуи судака Рыбинского водохранилища.* // *Биол. внутр. вод: Инф. бюлл.* № 49. С. 65–68.

Кошелев Б. В. 1971. *Некоторые закономерности роста и времени наступления первого икротетания у рыб.* // *Закономерности роста и созревания рыб.* С. 186–218.

Лапин Ю.Е. 1965. *О сезонном росте рыб и некоторых особенностях роста чешуи.* // *Теоретические основы рыбоводства.* С. 215–219.

Липская И. Я., Овен Л. С. 1970. *К вопросу о причинах периодичности роста рыб в тропической зоне океана.* // *Биология моря.* № 31. С. 236–245.

Мина М. В., Клевезаль Г. А. 1970. *Принципы исследования регистрирующих структур.* // *Успехи совр. биол.* Т. 70. № 3(6). С. 68–115.

Никольский Г. В. 1965. *Теория динамики стада рыб.* М., «Наука». 382 с.

Русанов В. В. 1979. *Влияние различных гидрохимических условий на содержание кальция в костях и чешуе сеголетков и двухлетков карпа.* // *Совр. вопр. экол. физиол. рыб.* С. 102–105.

Хрисанфова Е. Н., Перевозчиков И. В. 2002. *Антропология: Учебник.* 3-е изд. М.: Изд-во МГУ: Изд-во «Высшая школа». 267 с.

Чугунова Н. И. 1959. *Руководство по изучению возраста и роста рыб.* 164 с.

Шатуновский М. И. 1998. *Эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза.* // *Возрастная и экологическая физиология рыб.* Тез. докл. С. 107–108.

Шатуновский М. И. 2001. *Эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза рыб.* // *Экологические проблемы онтогенеза рыб: физиолого-биохимические аспекты.* С. 13–19.

Fleming W.R. 1968. *Electrolyte metabolism of teleost including calcified tissues.* // *Cemical Zoology.* V. 8.

Follet B. K., Nicholls T. J., Redshaw M. R., 1968. *The vitellogenic response in the South African clawed toad (Xenopus laevis Daudin).* *J. Cell Physiol.*, 72, suppl., 91–102.

Garrod D.J., Newell B.S. 1958. *Ring formation in Tilapia esculenta.* // *Nature.* V. 181. P. 1411–1422.

Krogh, A. 1939. *Osmotic Regulation in Aquatic Animals.* Cambridge University Press. pp. 242.

Menon N. 1953. *The determination of age and growth of fishes of tropical and subtropical waters.* // *J. Bombay Nat. Hist. Soc.* V. 51. N 3. P. 13.

Simkiss K. 1973. *Calcium metabolism of fish in relation to ageing.* // *The ageing of fish: Proceedings of an Int. Symp., 19–20 July, 1974.* P. 1–12.

THE CONTENT OF NATRIUM, POTASSIUM, CALCIUM, MAGNESIUM IN VERTEBRAS AND SCALES OF ROACH RUTILUS RUTILUS L. DEPENDING ON GONAD MATURITY

A.S. Mavrin, V.I. Martemyanov

*I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, RAS, Borok, Russia,
e-mail: mavr_as@mail.ru*

As a result of the studies it is shown that the most notable changes of the studied parameters were observed in vertebrae as compared to scales. The content of sodium in vertebrae of females missing spawning and spawning a new differed significantly from juvenile and pubescent for the first time fish. The content of potassium in vertebrae of mature females was less than in

impuberal ones. The reverse dependence was found in males. The content of calcium in vertebrae of pubescent females was higher than in impuberal females and amounted to 700 mg/kg of wet weight of bone tissue. The males demonstrated the reverse dependence. Differences in the magnesium content in scales and vertebrae of the investigated group of fish were not found.

ПОРОГОВЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КАТИОНОВ В ПРЕСНОЙ ВОДЕ НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ИОННОГО БАЛАНСА МЕЖДУ ОРГАНИЗМОМ ГИДРОБИОНТОВ И ВНЕШНЕЙ СРЕДОЙ

В. И. Мартемьянов, А. С. Маврин

*Учреждение Российской академии наук, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
пос. Борок, Ярославская обл., Россия,
e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru*

Введение

Минеральный состав воды является важнейшим экологическим фактором, который существенно влияет на ареал, развитие, рост, устойчивость и физиологические процессы гидробионтов. Уменьшение минерализации воды сопровождается увеличением нагрузки на системы обеспечения осмотического, ионного и кислотно-щелочного баланса организма. При достижении определенных минимальных концентраций того или иного электролита в воде, способность к поддержанию ионного гомеостаза нарушается. Вследствие этого границы ареала вида в низкоминерализованных водоемах определяются предельно низкими (пороговыми) концентрациями различных ионов во внешней среде при которых возможно поддержание ионного баланса между организмом и средой.

Метод определения пороговых концентраций основан на измерении кинетических характеристик трех параметров: скорости потери ионов из организма во внешнюю среду, скорости их активного транспорта из среды в организм и чистого (результатирующего) потока, представляющего разность между потерями и активным транспортом. При реализации используемого способа, гидробионты вначале акклимируются к широкому ряду различных концентраций изучаемых ионов. После этого животных перемещают на непродолжительное время (15–30 мин) вначале в дистиллированную, а затем пресную воду. По изменению содержания электролитов в экспериментальных средах рассчитывают скорость потери ионов из гидробионтов в дистиллированную воду и скорость их активного транспорта организмом из пресной воды. Находят такие концентрации ионов в воде, при кото-

рых потери из организма выше, чем поступление, что свидетельствует о неспособности поддержания ионного баланса. Этот способ является очень трудоемким, из-за чего применяется редко. Полученные данные по пороговым концентрациям носят фрагментарный характер и имеют отношение к моллюскам (Виноградов и др., 1987; Виноградов, 2000; Виноградов, Биочино, 2005).

Нами (Мартемьянов, 2008) был апробирован более простой способ по выявлению предельно низких концентраций натрия, калия, кальция, магния во внешней среде необходимых для поддержания жизнедеятельности *Dreissena polymorpha Pallas*. Метод основан на содержании организмов в дистиллированной воде и отбора проб воды во времени из экспериментальных емкостей для определения концентрации ионов. Целью настоящего исследования явилось определение пороговых значений содержания ионов натрия, калия, кальция, магния в пресной воде, необходимых для поддержания ионного баланса между организмом плотвы и внешней средой.

Материал и методика

Плотву *Rutilus rutilus L.* массой 50–100 г, отлавливали неводом в устье р. Шуморовка в октябре 2008 г. Пробы крови на анализ брали сразу после кратковременной (не более 10 мин) помимки, когда исследуемые показатели еще не успевают существенно измениться из-за стресса, вызванного отловом (Мартемьянов, 1982). Из одного притонения невода отбирали не более 6 рыб. При увеличении количества рыб и времени отбора проб проявляется стресс и содержание катионов в плазме и тканях особей заметно ме-

няется во времени. Обработка проб и аналитические процедуры описаны нами ранее (Мартемьянов, 1992).

Другая часть улова доставлялась в лабораторию. Рыбы помещались в аквариумы и в течение 10 сут акклимировались к лабораторным условиям. После акклимации, индивидуальные особи отлавливались, промывались в дистиллированной воде. Затем помещались в отдельные аквариумы, наполненные по 10 л дистиллированной воды. Свежая дистиллированная вода имеет кислую реакцию. Снятие кислотности осуществляли за счет пропускания через воду воздуха в течение 2–3 суток до посадки рыб. Подачу воздуха продолжали в дальнейшем в ходе всего эксперимента. Перед посадкой рыб в экспериментальные емкости, каждая особь вначале промывалась в пределах 1 мин в дистиллированной воде и затем помещалась в индивидуальный аквариум. Сразу после помещения рыб в индивидуальные емкости, из них с определенными интервалами времени отбирались пробы воды для анализа в ней содержания ионов натрия, калия, кальция, магния методом пламенной спектрофотометрии.

От 10 рыб взяли пробы крови и 10 особей употребили в экспериментах с дистиллированной водой.

Результаты исследования

Данные по содержанию катионов в речной воде и плазме крови плотвы, отловленной в природных условиях, представлены на рис. 1 (правая часть). Сравнение показывает, что концентрация ионов натрия и калия в плазме крови рыб была существенно выше, чем в среде, тогда как различия для кальция и магния были не большими.

После помещения рыб в дистиллированную воду, в начальный период наблюдалось постепенное повышение концентрации ионов в воде (рис. 2), свидетельствуя об их утечке из организма. При этом скорость потери ионов натрия была наиболее высокой, составляя $1,72 \pm 0,42$ мг/100 г сырой массы час. Ионы калия и кальция терялись из организма, соответственно, со скоростью $0,44 \pm 0,07$ и $0,79 \pm 0,46$ мг/100 г сырой массы час. Утечка ионов магния из организма плотвы составляла очень малую величину $0,07 \pm 0,03$ мг/100 г сырой массы час.

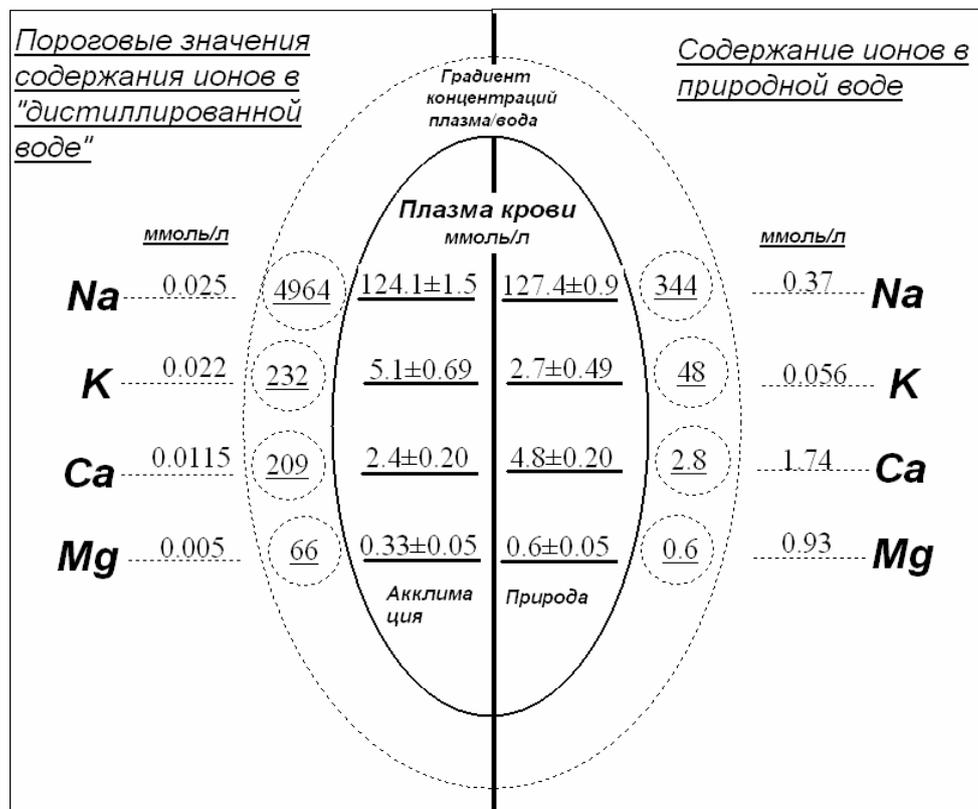


Рис. 1. Концентрация катионов в плазме крови плотвы, в речной воде и при пороговых значениях

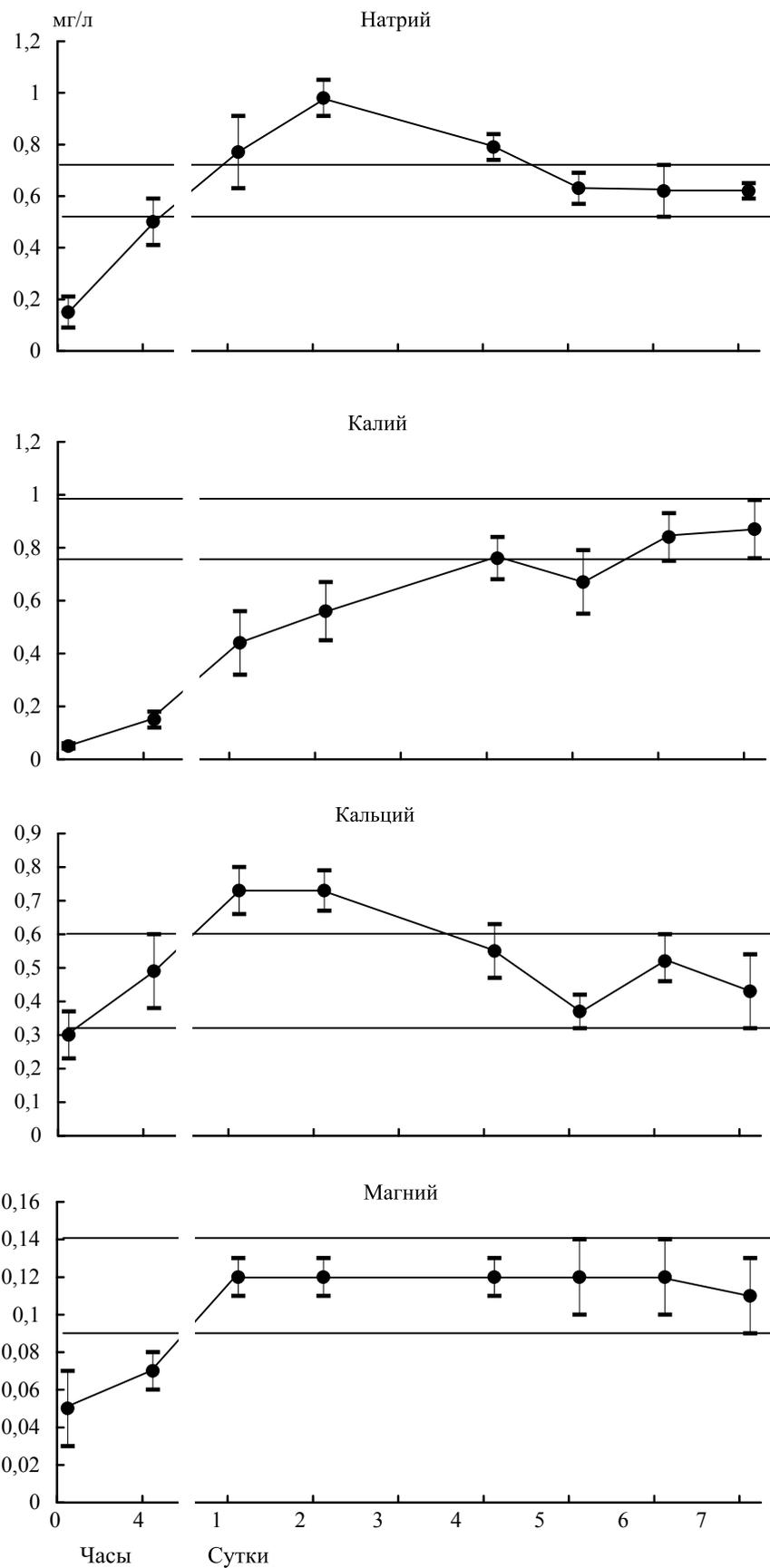


Рис. 2. Динамика содержания катионов в среде после посадки рыб в дистиллированную воду

На 5–7 сутки эксперимента содержание катионов в воде стабилизировалось на определенных уровнях, указывая на достижение ионного баланса между организмом и средой. То есть, скорости потерь ионов из организма и их обратный транспорт были уравновешены между собой, в результате чего содержание электролитов в воде имело стабильные значения. По отношению к рыбам из природы (рис. 1, правая часть), у животных при пороговых концентрациях (рис. 1, левая часть), градиенты ионов между внутренней и внешней средой возросли для натрия, калия, кальция, магния, соответственно, в 14,4, 4,8, 74,6, 110 раз.

Обсуждение результатов

После помещения рыб в дистиллированную воду, в течение первых 5 суток наблюдалось постепенное повышение с определенными скоростями концентрации различных ионов в воде (рис. 2), свидетельствуя об утечке электролитов из организма рыб. В дальнейшем, содержание катионов в воде стабилизировалось на определенных уровнях, указывая на достижение ионного баланса между организмом и средой. Скорости потерь ионов из организма и их обратный транспорт были уравновешены между собой. Эти минимальные концентрации ионов в воде, при которых достигается ионный баланс между организмом и средой, являются пороговыми (предельными) для выживания плотвы. При содержании электролитов в воде ниже пороговых, рыбы погибнут вследствие обессоливания организма.

Пороговые концентрации того или иного иона в воде для какого-либо вида представляют в виде среднего значения (Виноградов и др., 1987; Виноградов, 2000; Виноградов, Биочино, 2005). Эксперименты показывают, что на самом деле имеются индивидуальные различия в пороговых значениях содержания ионов в среде. Мы предлагаем выражать пороговые концентрации в виде диапазонов (рис. 2, отмечены горизонтальными линиями относительно оси абсцисс), которые регистрировались в стабильный период на 5–7 сутки опытов.

Увеличение продолжительности экспериментов до 14 суток оказалось нецелесообразным из-за накопления метаболитов в воде. Продукты жизнедеятельности рыб оказывали негативное влияние на физиологическое состояние организма. В ряде аквариумов, спустя 7 суток, мы ежедневно в течение недели заменяли часть воды (2

л из 10 л) на дистиллированную воду. Это предотвращало чрезмерное накопление продуктов обмена в среде. В этих случаях, всякий раз через 1 сутки, содержание ионов в воде вновь достигало исходных значений, которые наблюдались до разбавления среды.

Верхние и нижние границы диапазонов пороговых концентраций ионов в среде, зарегистрированные в двух экспериментах, несколько смещены относительно друг друга. Возможно, это отражает разное физиологическое состояние рыб, обусловленное сезонами года.

Уменьшение минерализации воды до пороговых значений сопровождается существенным увеличением градиентов ионов между внутренней и внешней средой рыб (рис. 1). Так, по отношению к природным значениям (рис. 1, правая часть), при пороговых концентрациях (рис. 1, левая часть), градиенты ионов между внутренней и внешней средой рыб существенно возросли. Эта ситуация усиливает нагрузку на систему обеспечения осмотического, ионного и кислотно-щелочного баланса организма, требуя на это дополнительных энергетических затрат. На основе этого можно предполагать, что с уменьшением минерализации воды темп роста плотвы будет снижаться.

По сравнению с содержанием ионов в речной воде (рис. 1, правая часть), пороговые концентрации (рис. 1, левая часть) ниже в среднем в 14,8, 2,5, 151,3, 186 раз, соответственно, для натрия, калия, кальция, магния. Видно, что наименьшие различия между содержанием ионов в речной воде и пороговыми концентрациями наблюдаются для ионов калия. Это показывает, что в природных условиях лимитирующим фактором для плотвы является содержание калия в воде.

В летний сезон в реках, озерах, водохранилищах, сильно заросших сине-зелеными водорослями, наблюдаются заморы рыбы. Это связывают с недостатком кислорода. Следует отметить, что в период массового развития водоросли потребляют из воды большие количества ионов калия. В результате концентрация этого элемента в воде может достигать критического уровня для рыб, усугубляя их состояние.

Данных по пороговым концентрациям ионов во внешней среде для других видов гидробионтов очень мало (табл.). Сравнительный анализ показывает, что способность извлекать ионы натрия, кальция и магния из внешней среды у плотвы намного выше, чем у двусторчатых моллюсков дрейссены и шаровки *Sphaerium*

suesicum West. Пороговая концентрация ионов натрия и кальция в воде для плотвы ниже, соответственно, в 3,3, 27,5, раза, чем у дрейссены и в

4,6, 5 раза, чем у шаровки. Способность поглощать ионы магния из внешней среды у плотвы в 2,4 раза выше, чем у дрейссены.

Пороговые концентрации катионов в среде для различных видов гидробионтов

Вид	Пороговые концентрации катионов в среде, мг/л				Ссылка
	Натрий	Калий	Кальций	Магний	
Плотва	0,3–0,7	0,8–1,2	0,2–0,6	0,05–0,15	Настоящие данные Мартемьянов, 2008 Виноградов и др., 1987
Дрейссена	1,63	0,06	11	0,24	
Шаровка	2,3	0,19	2	–	

Плотва хуже моллюсков извлекает из воды ионы калия. Пороговая концентрация ионов калия в воде для плотвы в 16,7 и 5,3 раза больше, чем для дрейссены и шаровки.

Выводы

1. Пресноводные гидробионты обладают структурами и системами, которые позволяют им эффективно поглощать различные ионы из внешней среды для поддержания осмотического, ионного и кислотно-щелочного баланса организма.

2. Минимальные концентрации катионов во внешней среде, при которых транспортные системы плотвы способны извлекать ионы для обеспечения нормальной жизнедеятельности организма, составляют, соответственно, для натрия, калия, кальция, магния 0,52–0,72; 0,76–0,98; 0,32–0,60; 0,09–0,14 мг/л. При более низких уровнях ионов в воде у плотвы преобладают потери электролитов из организма, компенсация которых возможна только за счет потребления с пищей.

Литература

Виноградов Г. А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
 Виноградов Г. А., Биочино Г. И. Физиологические особенности моллюсков *Dreissena polymorpha* (Pall.) и *Dreissena bugensis* (Andr.), обитающих в Рыбинском водохранилище // Биол. внутр. вод. 2005. № 3. С. 74–78.
 Виноградов Г. А., Клерман А. К., Комов В. Т. Особенности ионного обмена пресноводных моллюсков в условиях высокой концентрации ионов водорода и низкой минерализации внешней среды // Экология. 1987. № 3. С. 81–84.
 Мартемьянов В. И. Стресс как источник ошибок при эколого-физиологических и биохимических ис-

следованиях рыб // Оценка погрешностей методов гидробиологических и ихтиологических исследований. Рыбинск, 1982. С. 124–134.
 Мартемьянов В. И. Содержание катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани рыб Волжского плеса Рыбинского водохранилища // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1992. Т. 28. № 5. С. 576–581.
 Мартемьянов В. И. Роль систем ионного транспорта в распространении дрейссены // Дрейссениды: эволюция, систематика, экология. Лекции и материалы докладов I-ой Международной школы-конференции. Борок, 2008. С. 93–97.

THRESHOLD CONCENTRATION OF CATION IN WATER NECESSARY FOR MAINTENANCE OF IONIC BALANCE BETWEEN AQUATIC ORGANISMS AND ENVIRONMENT

V.I. Martemyanov, A.S. Mavrin

*I.D. Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Science,
 Borok, Yaroslavl region, Russia,
 e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru*

The simple method by definition of extremely low concentration of sodium, potassium, calcium, magnesium in environment, necessary for maintenance of ability to live of aquatic organisms is offered. Cited

the data on threshold concentration of ions of sodium, potassium, calcium, magnesium in water necessary for maintenance of ionic balance between organism of three species of aquatic organisms and environment.

ГИСТОГЕНЕЗ ГОНАД, КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АНДРОГЕНАМИ НА *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) И *HUSO HUSO* X *ACIPENSER RUTHENUS* (ГИБРИД БЕСТЕРА (F₂))

К. В. Метальникова

Федеральное государственное унитарное предприятие Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии. (ФГУП ВНИРО), г. Москва. Россия,
e-mail: ksenia@vniro.ru

Изучали воздействие андрогенов на реверсию вторичных половых признаков у форели, стальноголового лосося и бестера в разных климатических зонах России с 1978 по 1996 гг. При этом наблюдали высокое содержание гемоглобина в крови и увеличение выживания у рыб, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Гибрид F₂), по сравнению с контролем. У экспериментальных рыб с увеличением уровня процессов метаболизма происходили изменения в гонадах. Показали, что андрогены вызывают общие процессы изменений в гонадах обработанных рыб: а) ускоренное развитие ооцитов у генетических самок по сравнению с контрольными, у *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Гибрид F₂); б) дегенеративные изменения в ооцитах и развитие семенников; в) нормальное развитие семенников, но пронизанных кровеносными сосудами. Процессы реверсии половых признаков у рыб, обработанных аналогами тестостерона, продолжают после окончания обработки их гормонами. Разные реверсанта лососевых в потомстве производят разное количество самок от 60 до 100%. Это зависит от генетических особенностей реверсантов. Зрелых реверсантов скрещивали с обычными самками прижизненно. Для предсказания выхода реверсантов использовали гистологические методы исследования гонад. Некоторых реверсантов использовали в течение нескольких лет. Отбирали реверсантов методом визуальной диагностики при нересте. Потомство *O. mykiss* (преимущественно самки) были получены дважды за два года. Потомство не обрабатывали андрогенами. Искусственное вмешательство в нормальное развитие самок воздействием андрогенами, возможно, провоцирует

ответную реакцию образованием вторичных половых признаков самцов у самок, как наиболее рациональный путь физиологической реализации отдельных самок при неблагоприятных внешних условиях в ответ на воздействие аналогами тестостерона.

Введение

Общеизвестно, что для самцов большого количества видов рыб методы криоконсервации половых продуктов (спермы) разработаны, а для половых продуктов самок, их еще нет. Получив реверсантов с геномом самок, можно провести криоконсервацию спермы, сохраняя геном самок в криоконсервированной сперме реверсантов (Метальникова, Манохина, Ананьев, 1999; Метальникова, Ананьев, Анохина, 2000). Схема получения преимущественно самок широко известна: на первом этапе получаем небольшое количество реверсантов с использованием аналогов тестостерона из небольшого количества обычной молоди, отбираем реверсантов из самок и, на втором этапе, полученных реверсантов скрещиваем с обычными самками. В потомстве получаем преимущественно самок за счет гомогаметности самок, которых выращиваем до созревания по обычной, свойственной данному виду рыбы, биотехнологии. При этом никакого вмешательства в геном самок не происходит. Количество реверсантов можно ограничить за счет высокой оплодотворяющей способности спермы реверсантов и высокой жизнестойкости самок – потомства реверсантов (самки XX x самцы (реверсанты) XX > самки XX). (Метальникова, 1989). В России методы получения реверсантов и интерсексов разрабатывались с 1978 года для лососевых видов рыбы и частично

осетровых (бестера и русского осетра) (Метальникова, 1987, 1989; Metalnikova, 2008) и с 1980 г. для карповых (Гомельский, 1985) с использованием андрогенов. Одних и тех же реверсантов стальноголового лосося и форели использовали не менее двух нерестовых сезонов (Метальникова, 1992, 2002; Метальникова, Голубев, 2000). Изучали различные способы: обработки гормонами, изменения в динамике и условиях кормления и содержания, продолжительности выращивания реверсантов до половозрелости, способах идентификации реверсантов. На осетровых рыбах нами проводились поисковые экспериментальные разработки (Метальникова, 1989; Metalnikova, 2008). Основой для подобных разработок послужили предпосылки эволюционного развития эндокринной системы у животных. У рыб имеются следующие железы внутренней секреции: гипоталамус, подбугорная область головного мозга состоит у костистых рыб из преоптического ядра, латерального ядра и комплекса, составляющего паравентрикулярный орган, нервные волокна направляются к гипофизу, у всех костистых рыб они являются парными, отростки клеток латерального ядра также сообщаются со спинномозговой жидкостью (Максимович, 1987). Паравентрикулярный орган был обнаружен: у радужной форели, серебряного карася, угря, плотвы, трех видов бычков, пецилии, лососей, карпа и тиляпии. Он располагается в каудальных отделах гипоталамуса. Нервные тракты, ведущие от паравентрикулярного органа, идут к преоптическому ядру и латеральному ядру, а другие – к гипофизу. Латеральное ядро осуществляет регуляцию гонадотропной функции, многообразный контроль приспособительных реакций костистых рыб к условиям внешней и внутренней среды: катехоламины гипоталамуса участвуют в регуляции синтеза и выведения пролактина, кортикотропина и, у некоторых видов, тиреотропина гипофиза, участвующих в осморегуляции у рыб. Синтез и секреция гормона контролируется тиролиберином. α -субъединицы тиреотропного гормона и трех других родственных гормонов кодируются одним геном, β -субъединицы – разными. Каждая субъединица вначале синтезируется на отдельной матричной РНК. Синтез углеводных цепей происходит в процессе трансляции или после ее завершения. Явление нейросекреции (выработка гипоталамусом либеринов и статинов) неотделима от существования нервной клетки. Сами гипоталамические гормоны на ранних этапах эволюции играли роль нейромедиаторов и мо-

дуляторов нервных клеток. На более позднем этапе эволюции они приобрели способность регулировать секреторную функцию гипофиза. Гипофиз имеет три доли: переднюю (главную), промежуточную и заднюю (или нервную), а также переходную зону (между передней и промежуточной долями). У костистых рыб пролактин, вырабатываемый в передней доле гипофиза усиливает образование разбавленной мочи, что, например, у *Fundulus* является приспособительной реакцией при резкой смене морской воды на пресную. У ганойдов и костистых – аргинин-вазотоцин и изотоцин. Аргинин-вазотоцин – является примитивным антидиуретическим гормоном. Гонадотропные гормоны гипофиза регулируют процессы созревания рыб и обуславливают сложное половое поведение рыб, гонадотропины действуют на фолликулярные клетки, которые, выполняя эндокринные функции, вырабатывают прогестериноподобное вещество, вызывающее созревание ооцитов. У самцов эндокринные функции выполняют интерстициальные клетки, сходные с клетками Лейдига (Kimberg et al., 1999). Половые гормоны самцов: андрогены и самок: эстрогены и прогестерон, который продуцируется желтым телом. Места синтеза половых гормонов: железистые клетки теки и фолликулярные стромы яичников у самок, интерстициальные клетки у самцов. Гонадотропные гормоны вырабатываются у большинства костистых рыб, промежуточной долей гипофиза, а у осетровых – передней долей гипофиза. Осетровые, в эволюционном плане, в отношении распределения функций в частях гипофиза стоят ближе костистых к амфибиям (Гербильский, 1947). Функциональная пластичность гипофиза осетровых – выработка гонадотропных гормонов осенью и либо выделение его, либо депонирование (в мозговых желудочках) до весны – одна из существенных эволюционных предпосылок пластичности рыб в отношении перехода от осеннего к весеннему икротетанию и от весеннего к осеннему (Баранникова, 1969; Баранникова, Баюнова, Гераскин, Семенова, 2000). Гипофиз выделяет тиреотропный гормон, вырабатываемый в промежуточной доле гипофиза, который влияет на развитие и функцию щитовидной железы. Например, у сельхозных, выводится в лимфатические щели и щитовидная железа располагается впереди брюшной аорты (разрастается из уростилиа при эмбриогенезе), у костистых рыб она охватывает брюшную аорту в области передних жаберных дуг и секрет её выводится непосредственно в кровь – тироксин:

он стимулирует обмен веществ у рыб, стимулирует метаморфоз у рыб (доказано для угрей, сельдей, осетровых), стимулирует темп роста, влияет на пигментацию у рыб (у лососевых – наиболее ярко), стимулирует темп роста, влияет на липидный обмен, осмотическую регуляцию. Большая функциональная пластичность щитовидной железы является существенной предпосылкой эволюционной пластичности рыб. Сочетание свойств пластичности гипоталамо-гипофизарной системы и щитовидной железы с особенностями годового цикла гонад большинства рыб с весенним нерестом (озимых форм) является основой высокой эволюционной пластичности системы коррелятов, контролирующей и осуществляющей процесс размножения у рыб – основной предпосылкой развития адаптивных особенностей биологии размножения у рыб. Изменчивость функций этой системы коррелятов является исходным материалом для отбора и дивергенции при образовании физиологически изолированных биотопов и рас в пределах вида. Обнаруженные особенности свойств гипофиза, щитовидной железы с особенностями годового цикла гонад являются основой развития адаптивных особенностей биологии размножения у рыб (Гербильский, 1949). Рядом экспериментальных исследований было установлено у млекопитающих, птиц, земноводных, костистых рыб функционирование щитовидной железы и гипофиза происходит **одновременно** на ранних этапах эмбрионального и постэмбрионального онтогенеза и сводится к «...обеспечению все возрастающей регулируемости формообразования за счет стабилизации метаболизма эмбриона...» (Яковлева, 1949). У колюшки щитовидная железа начинает функционировать к концу 2-й недели постэмбрионального развития, у севрюги с 4 дня постэмбрионального развития, а гипофиз у севрюги функционирует с 10–26 дня развития. У русского осетра щитовидная железа начинает функционировать, начиная с 2-го дня постэмбрионального развития, а с 4–5 дня к 26 дню начинается выведение секрета щитовидной железой в организм, при этом гипофиз в этом возрасте у русского осетра представляет собой эмбриональную, анатомически недифференцированную железу. (Яковлева, 1949). Биологическая суть процесса заключается в том, что андрогены, проникая через пищеварительный тракт в кровь рыб, воздействуя на мозг, гипоталамо-гипофизарную систему, внутренние органы и, как конечный объект воздействия – на гонады, вызывают существенные соматические пере-

стройки всего организма. Переориентируют, в процессе формирования, вторичные половые признаки у генетических самок на вторичные половые признаки самцов, не затрагивая генетические аспекты определения пола (Метальникова, 1990, 1992, 2002а), Что особенно ярко проявилось и подтвердили, впервые, эту гипотезу, результаты, полученные во ВНИИПРХе на личинках и молоди гиногенетической севрюги при обработке их эстрогенами: в результате работы были получены самки, хотя в гиногенетическом контроле превалировали самцы. При обработке молоди русского осетра, стерляди и бестера 17 α -эстрадиолом получили преобладающее количество самок до 85% (Ковалев, Купченко, Дума, Дума, Пономарев, Рекубратский, 2008). Процесс реверсии пола продолжается после окончания обработки рыб гормоном и завершается формированием полноценных функциональных самцов (Метальникова, 1989, 1992, 1995; Метальникова, Голубев, 2000). При оплодотворении спермой реверсантов икры от обычных, не обработанных гормонами самок, получают в потомстве преимущественно самок у лососевых рыб (Donaldson et al., 1991; Choy et al., 1996). То есть, в результате, происходит скрещивание генетических самок. Сперму брали у реверсантов лососей прижизненно, ежегодно в нашей стране (Метальникова, 1992, 2002 а, б; Метальникова, Голубев, 2000). Сроки обработки гормоном в большой степени зависят от вида рыбы, условий внешних факторов и хода генеративного роста у обработанных гормоном рыб.

Материал и методики

Материалом исследования послужили лососевые. Сеголетки бестера F2, обработанные тестостерон-пропионатом (ТП) в масляном растворе в нескольких дозировках, при скармливании его с комбикормом ОС-1 (Бондаренко, 2003) с перехода личинок на внешнее питание были исследованы на первом этапе, после окончания обработки их ТП. На основании проведенных исследований на разных видах рыб, получавших аналоги тестостерона в корме на ранних этапах онтогенеза, была проведена производственная проверка способов получения реверсантов форели в Заполярье, таблица 1. В Калининградской области также провели производственную проверку метода. Кроме опробованных способов получения реверсантов, обработали метилтестостероном (МТ) гиногенетическую форель,

полученную С. А. Горшковым (Gorshkov S. A. et al., 1990) (используя её, как контрольный вариант), таблица 1. Для лососевых рыб проводили исследования на стальноголового лосося, форели, балтийской форели, ладожской форели в

разные годы, в разных климатических условиях при оптимальном культивировании, обрабатывая молодь рыб метилтестостероном (МТ) и тестостерон-пропионатом (ТП) в спиртовом растворе, таблица 1.

Таблица 1. Схема проведения работ по получению реверсантов с использованием аналогов андрогенов

Оncorhynchus mykiss(Walbaum), место работы, год*****	Дозы МТ, мг/кг корма	ДозыТП, мг/кг корма	Выход рыбы с реверсией гонад, %
оз. Селигер, 1980, радужная форель	не проводили	1	88,2
	не проводили	6	83,3
	не проводили	16	100,0
Донецкая область, 1981, гибрид бестера F2Huso huso x Acipenser ruthenus (F2)	не проводили	1(в масле)	+*
		16(в масле)	-*
		32(в масле)	+*
Краснодарский край, 1985 г., стальноголовый лосось	3	3	81,8/66,8**
	6	6	77,8/77,8***
Калининградская обл., 1990, балтийская гибридная форель	3(после гиногенеза и купания икры в р-ре МТ)	нет****	100,0
	6	нет	92,8
	не проводили	6	83,3
Калининградская обл., 1996, балтийская гибридная форель	5		75,0
Заполярье, 1991, ладожская форель	3 (после купания в р-ре в 437,1 мкг МТ/л Н ₂ О)	нет	83,0
	6	нет	85,7

Примечание: * + есть признаки реверсии, – не обнаружено признаков реверсии;** в числителе выход самок с реверсией при обработке молоди метилтестостероном, в знаменателе при обработке молоди стальноголового лосося тестостерон-пропионатом; *** то же, что и в предыдущем столбце; ****нет, то есть не проводили; ***** длительность обработки комбикормом с гормонами не менее 800 градусо-дней, начало обработки рыбы гормонами рассчитывали индивидуально по каждому виду рыб, в зависимости от температуры воды, в контроле соотношение полов было 1:1.

В ходе исследований проводили комплексное изучение всех морфометрических показателей, энергетического обмена у рыб на основе метода определения интенсивности потребления кислорода молодь на 1 грамм живой массы в 1 час (Строганов, 1962), гистологического строения внутренних органов рыб (Роскин, Левинсон, 1957), прежде всего, гонад. Проверляли реверсантов по потомству, скрещивая их с обычными, не обработанными гормонами, самками (Метальникова, Бурцев, Слизченко, 1989; Метальникова, 1992, 2002а, б; Метальникова, Голубев, 2000). Принципиальное отличие наших методик, от применяемых за рубежом и у нас в стране (Инрыбпром, 2000; Yue et al., 1986), заключается в отборе реверсантов прижизненно и их использовании в нескольких нерестовых сезонах (Метальникова, Привезенцев, 2009). Количество реверсантов, используемых в товарном рыбоводстве, легко ограничить за счет высокой оплодотворяющей способности спермы реверсантов и высокой жизнестойкости самок – их потомков (Метальникова, Голубев, 2000; Метальникова, Анохина, Ананьев, 2000; Метальникова, 2002а, б).

Результаты и обсуждение

На рисунках 1, 2 и 3 представлены сагиттальные срезы гонад различных видов лососей из разных климатических областей России, полученные в разные годы, таблица 1, но с одним и тем же принципом формирования вторичных половых признаков самцов у генетических самок лососей в гонадах под воздействием разных аналогов тестостерона, а также срез гонады самки – из потомства реверсантов, полученных в Калининградской области, рисунок 4. Такие же самки были получены в Краснодарском крае от реверсантов стальноголового лосося.

Получены следующие общие закономерности в развитии реверсантов вне зависимости от способов, доз андрогенов, вида обрабатываемой рыбы и места проведения работ, в разных климатических зонах:

1. Более интенсивное потребление кислорода на единицу массы, рисунки 5, 6, 7, 8.

Это способствовало увеличению содержания гемоглобина в крови и повышало уровень выживания по сравнению с контролем, рисунки 9, 10, 11.

Наблюдавшиеся изменения в гонадах экспериментальных самок были результатом более интенсивного обмена веществ, что отразилось не только на строении гонад, но и на всем экстерьере реверсантов. (Шентякова, 1986, Метальникова, 1987, 1989; Метальникова, Привезенцев, 2009). Процессы реверсии пола у обработанных аналогами тестостерона рыб продолжались после окончания скормливания рыбам гормонов, вместо овариальной ткани происходило размножение гониальных клеток: не успевали вступать в фазу протоплазма-

тического роста, предполагающего более медленный энергетический обмен у самок, рисунки 1, 2, 3, и, продолжали делиться митотически. Далее вступали в первое мейотическое деление созревания, образуя сперматогонии в семенных ампулах. Продолжали развитие по типу семенника, и завершалось всё образованием тестикулярной ткани. Причем, чаще наблюдались асинхронные деления гамет в разных лобулах, в межлобулярных пространствах осталось от овариальной ткани множество кровеносных сосудов (рис. 15 и 16).

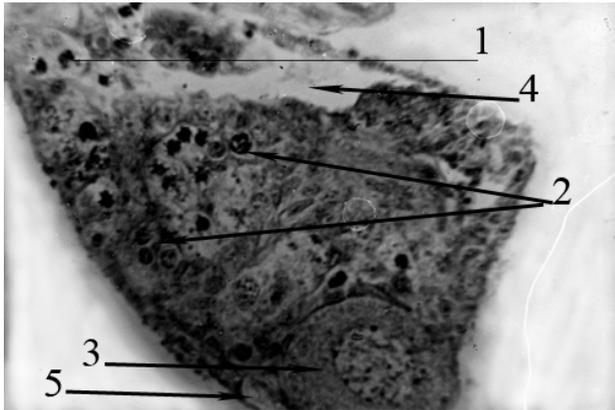


Рис. 1. Интерсекс. Ладожская форель Иммерсия МТ и 3 мг МТ /кг в корме. Заполярье. 1 – анафаза митотического деления гоний, 2 – телофаза, 3 – ооцит на 2 ступени фазы протоплазматического роста, 4 – выводной проток, 5 – метафаза. Ув. 100х

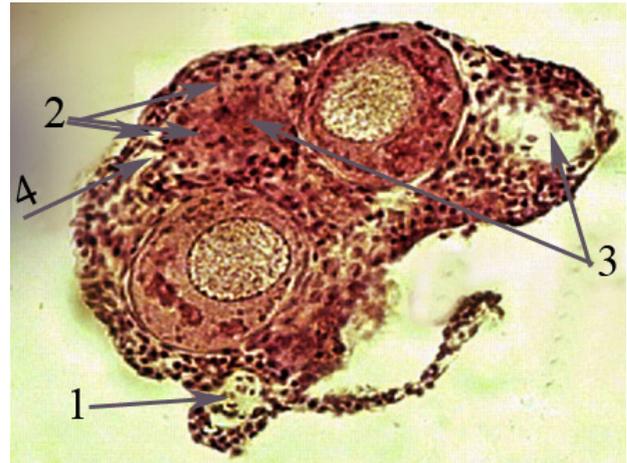


Рис. 2. Реверсант. Радужная форель. 6 мг ТП /кг в корме. 1 – дорсальный кровеносный сосуд, 2 – митотические деления сперматогоний типа Б, образующих семенную ампулу, 3 – резорбировавшиеся ооциты, 4 – выводной проток. Оз. Селигер. Ув. 200х



Рис. 3. Интерсекс. 1 – амитоз ооцитов, 2 – кровеносные сосуды с дорсальной стороны гонады, 3 – ооциты на ранней 3 ступени фазы протоплазматического роста, 335 дн. форель, Донрыбкомбинат. Ув. 400х

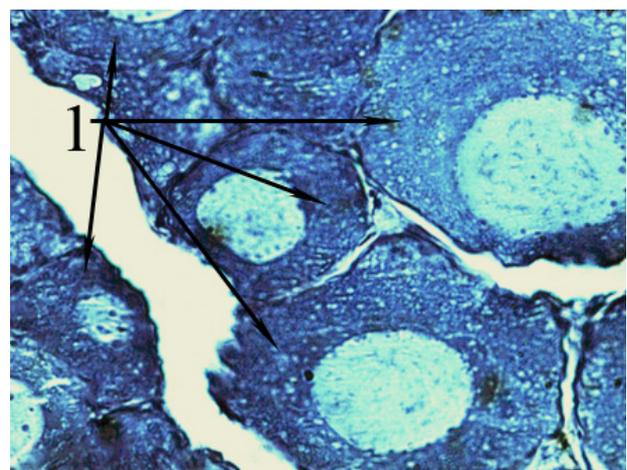


Рис. 4. Потомство реверсантов балтийской форели (*Oncorhynchus mykiss*), самка, 1+, Калининградская обл. 1 – ооциты на 2-й ступени фазы протоплазматического роста ооцитов, развитие ооцитов синхронное, но форель 2 месяца не кормили, поэтому стенки ооцитов не ровные, дегенерирующих ооцитов, при этом, нет. Ув. 400х

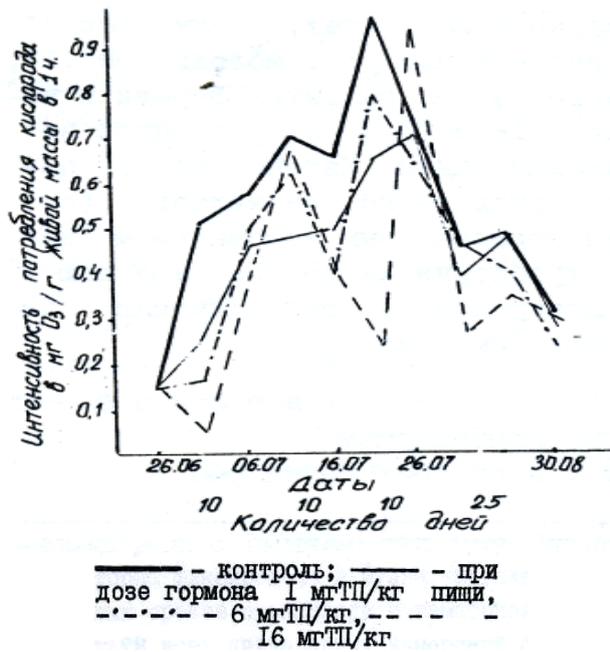


Рис. 5. Интенсивность потребления кислорода в мг O_2 /грамм живой массы в 1 час молодь форели при обработке её тестостерон-пропионатом, оз. Селигер

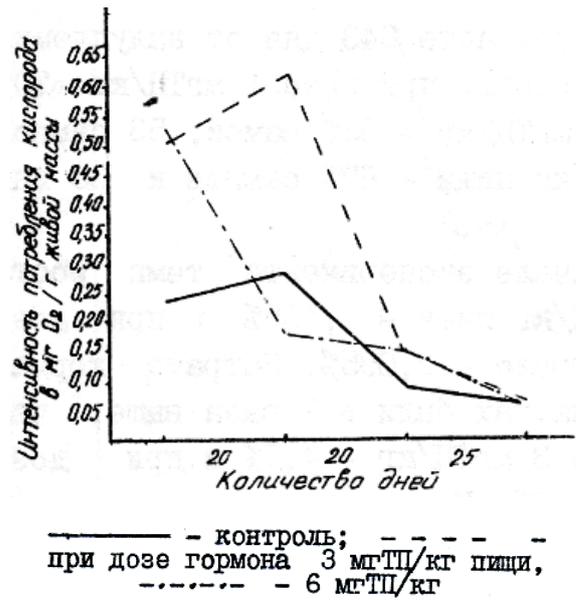


Рис. 6. Интенсивность потребления кислорода в мг O_2 /грамм живой массы в 1 час молодь стальноголового лосося при скармливании корма с аналогами тестостерона, Краснодарский край

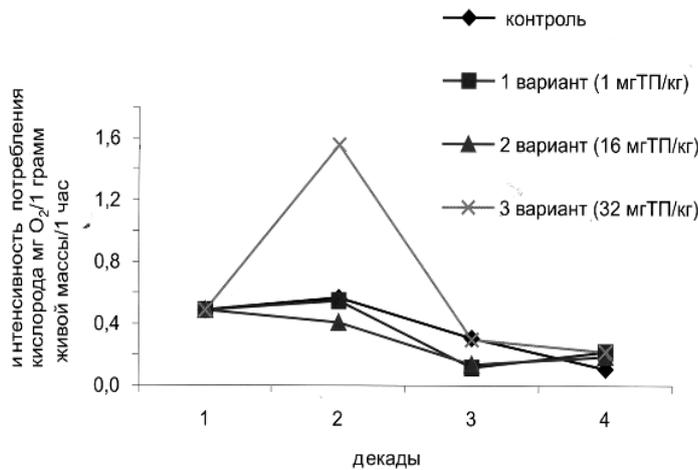


Рис. 7. Интенсивность потребления кислорода в мг O_2 /грамм живой массы в 1 час молодь бестера F_2 , Донецкая область

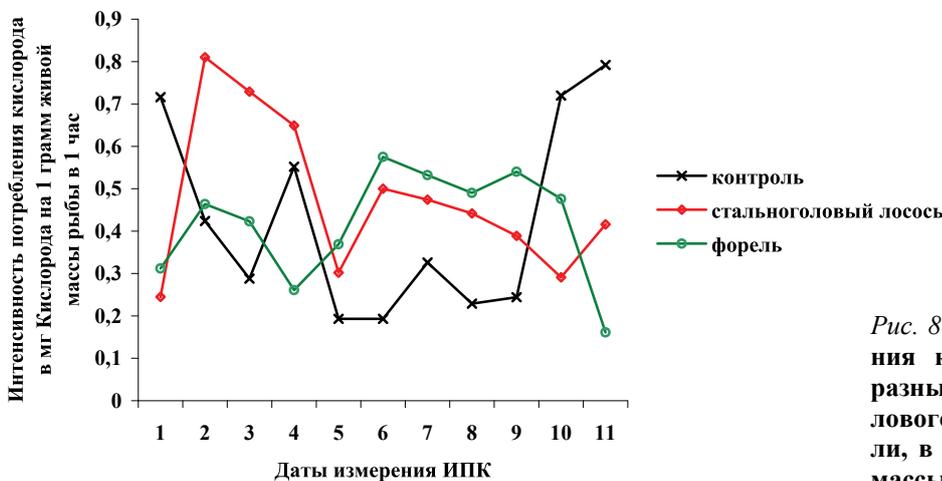


Рис. 8. Интенсивность потребления кислорода, в среднем, по разным регионам у стальноголового лосося и радужной форели, в мг O_2 / на 1 грамм живой массы рыбы в 1 час

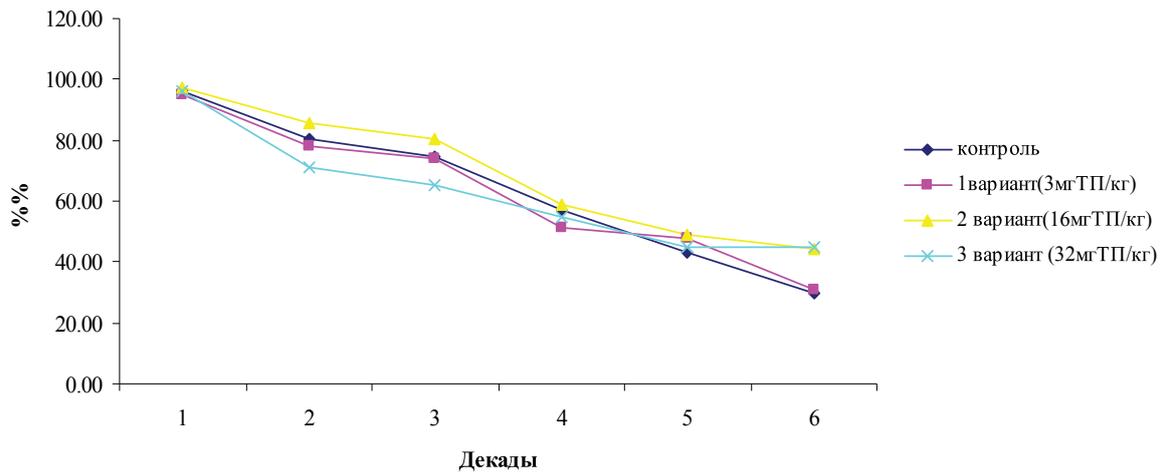


Рис. 9. Выживание молоди бестера в экспериментальный период

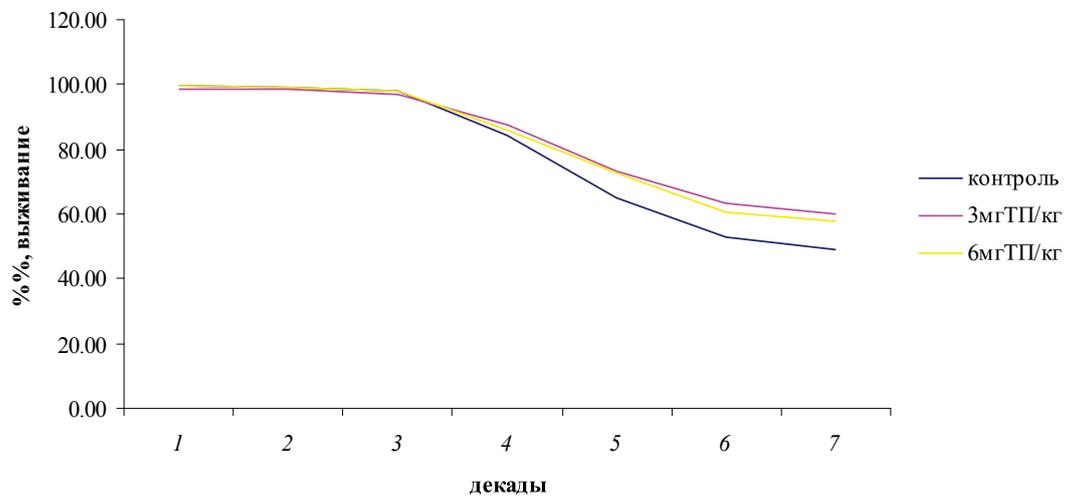


Рис. 10. Выживание стальноголового лосося при скармливании аналогов тестостерона

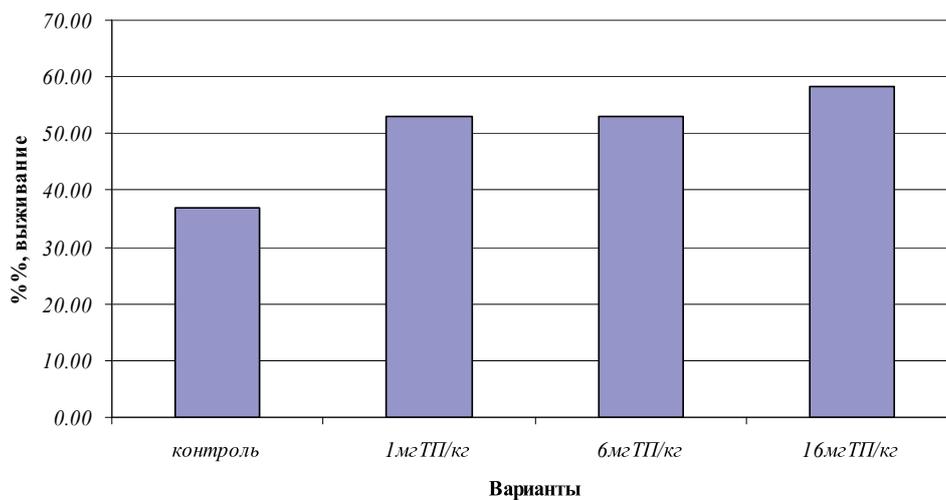


Рис. 11. Выживание радужной форели в результате скармливания аналога тестостерона

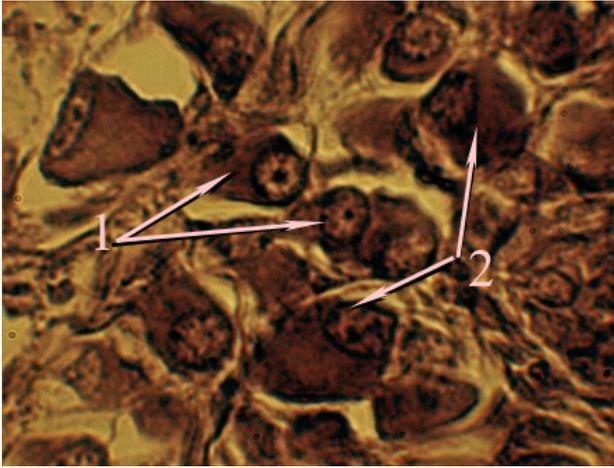


Рис. 12. Срез гонады бестера F₂ в возрасте 92 дня от вылупления из II варианта, получавшего 16мг тестостерон-пропионата в масле на 1 кг корма. Донецкая область. 1 – первичные половые клетки перед митотическим делением, 2 – ооциты синаптенного пути. Увеличение 1000х

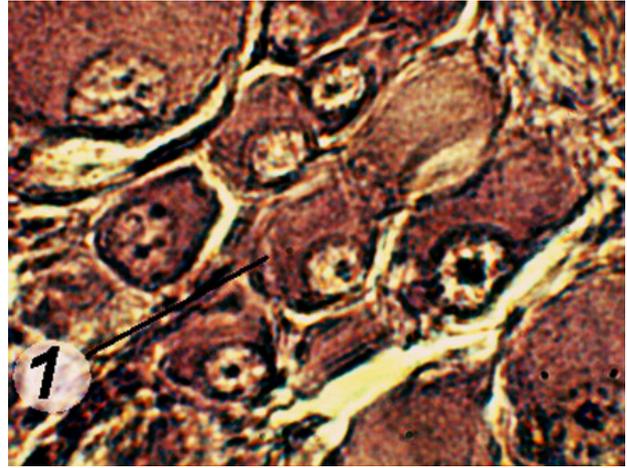


Рис. 13. Срез гонады бестера F₂ в возрасте 92 дня от вылупления из II варианта, получавшего 16 мгТП/кг. Донецкая область. 1 – митоз. Увеличение 1000х

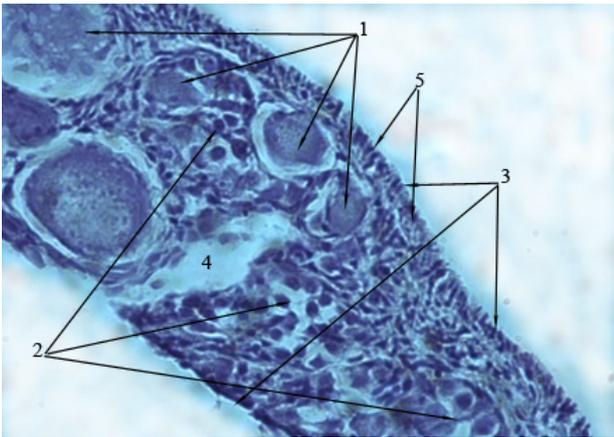


Рис. 14. Срез гонады ладожской форели, в возрасте 1+, Заполярье. 1 – резорбции ооцитов разными способами, 2 – формирование гониальных клеток в местах резорбированных ооцитов, 3 – оболочка резорбирующегося яичника, 4 – проток, 5 – интерстициальные клетки. Увеличение 400х

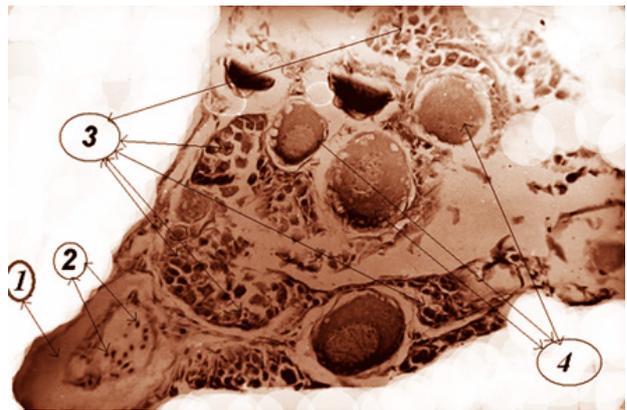


Рис. 15. Срез гонады стальноголового лосося в возрасте 285 дней от перехода на внешнее питание, из I варианта, получавшего, 3мгМТ/кг корма. Краснодарский край. 1 – резорбирующийся ооцит за счет фагоцитоза, 2 – лейкоциты, 3 – размножение гониальных клеток на месте резорбированных ооцитов, 4 – резорбирующиеся ооциты на 1 степени фазы протоплазматического роста с пустотами по краю цитоплазмы. Увеличение 140х

За счет этого, впоследствии, сперматозоиды у реверсантов обладали повышенной двигательной активностью и продолжительностью поступательного движения, но порции спермы, при её сцеживании, у реверсантов, были небольшие. В результате исследований, в динамике формирования гонад реверсантов у лососей и бестера-F₂ выявили общие закономерные изменения через «интерсексуальную стадию развития»:

а) опережающее по сравнению с контролем развитие гонад у самок, рисунки 12, 13;

На рис. 12 первичные половые клетки перед митотическими делениями, они характеризуются (Персов, 1966, 1975) чёткими клеточными границами, со светлым, пузырьчатым ядром, с одним, центрально расположенным, ядрышком – 1; возможно, оогонии – 2; возможно, ооцит синаптической стадии – 3. На рис. 13 митотические деления гониальных клеток – 1.

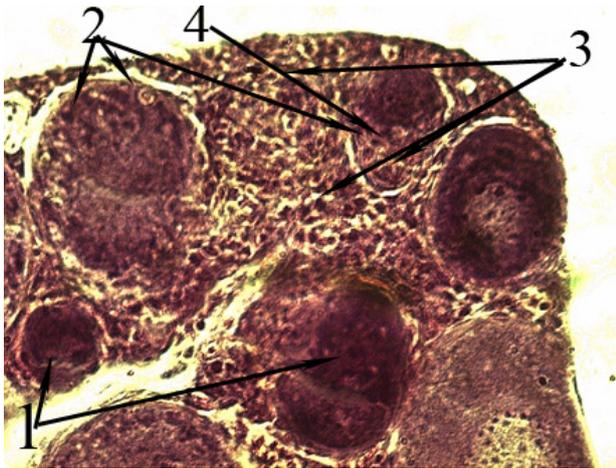


Рис. 16. Срез гонады радужной форели в возрасте 335 дней от перехода на внешнее питание из II варианта, получавшего бмгТП/кг корма, оз. Селигер. 1 – автолиз ооцитов, 2 – лизис цитоплазмы ооцита фагоцитарными клетками, размножение гонимальных клеток в межовариальных пространствах – 3 и на месте резорбированных ооцитов – 4. Ооциты на 1–2 ступени фазы протоплазматического роста ооцитов. 2 стадия зрелости. Увеличение $\times 200$

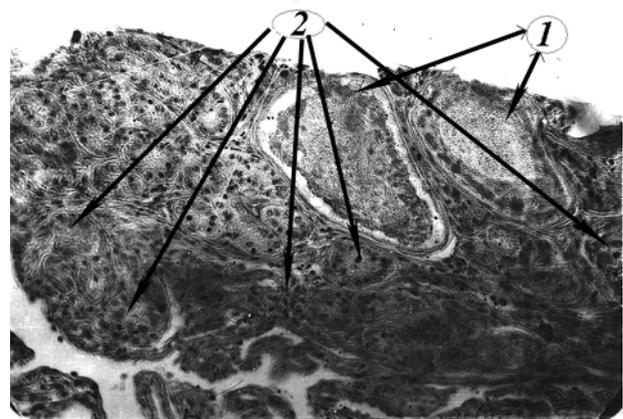


Рис. 17. Срез гонады стальноголового лосося из I варианта, получавшего 3мгМТ/кг корма. Краснодарский край. **Переходная область от овариальной ткани к тестикулярной ткани в гонаде будущего реверсанта:** 1 – резорбирующиеся ооциты на 3 ступени фазы протоплазматического роста ооцитов, 2 – формирование семенных ампул в стромальной ткани с гониями. Увеличение 400х

б) дегенеративные изменения в гонадах самок на стадии протоплазматического роста ооцитов (резорбции – до 100% ооцитов), рисунки 14, 15, 16.

в) на месте дегенерирующих ооцитов и в межовариальных пространствах размножения гонимальных клеток, специализация их и развитие по типу сперматогоний, рисунки 16; 17.

г) формирование семенных ампул – рисунок 16;

д) постепенное вытеснение овариальной ткани тестикулярной, рисунок 17;

е) формирование функциональных семенников и окончательное формирование у самок вторичных половых признаков полноценных самцов, продуцирующих сперму, рисунки 18 а, б, в.

На основании вышеизложенного мы делаем вывод, что начавшиеся процессы реверсии пола у бестера (F_2) при воздействии тестостерон-пропионатом, могут привести к полной реверсии вторичных половых признаков, но с большим разбросом на стерильных особей, интерсексов и реверсантов из самок. В ходе всех проведенных работ и изучения литературных источников выявлен общий механизм переориентации вторичных половых признаков у будущих реверсантов на гистологическом уровне вне зависимости от вида рыб, гормона или климатической области, где проводилась работа (Метальникова, 1989, 1992, 1995; Метальникова, Голубев, 2000). На ос-

новании этого был предложен способ прогнозирования выхода реверсантов (Метальникова, 1999). От реверсантов стальноголового лосося и балтийской форели получали потомства с преобладанием самок, доля которых варьировала от 60 до 100% у различных реверсантов, рисунок 19, таблица 3. Скрещивали трех реверсантов форели в Калининградской области и одиннадцать реверсантов стальноголового лосося в субтропиках – индивидуально каждого реверсанта с несколькими, одними и теми же, обычными, не обработанными гормонами самками. Часть реверсантов использовали по два нерестовых сезона в обеих климатических областях, рисунок 19, таблица 2.

Форель из контрольных садков имела соотношение полов самок: самцам = 46:54 (%). При этом их прирост зависел от количества самок в потомстве реверсантов, рисунок 20.

В субтропиках выход самок в потомстве стальноголовых лососей варьировал у разных реверсантов, таблица 2.

Таблица 2. Выход самок в потомстве у реверсантов стальноголового лосося в субтропическом климате Краснодарского края, 1987–1988 гг.

Варианты реверсантов	1а	1б	1в	1г	1д	1е	2а	2б	4а	4б	4в
Выход самок в 1987 г., %	100	83	100	83	0	100	75	100	100	100	0
Выход самок в 1988 г., %	100	93,6	0	0	100	0	0	83	100	100	100

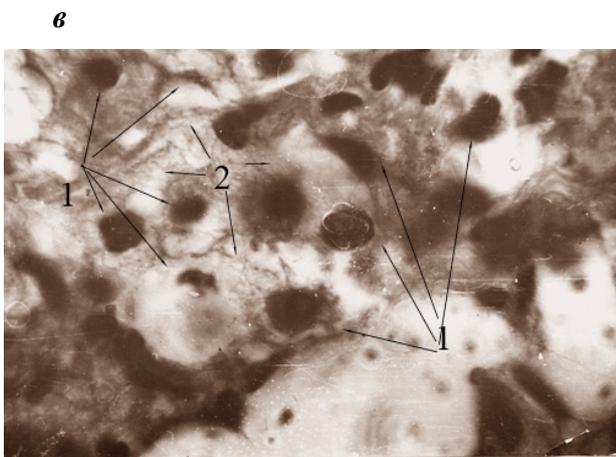
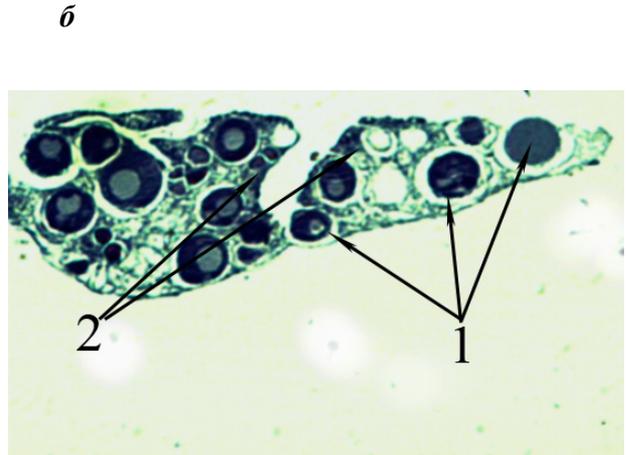
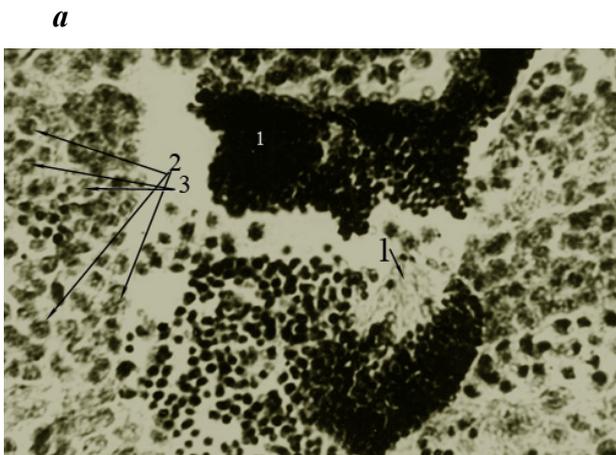


Рис. 18. а) тестикулярный участок интерсекса, возраст 2+. III-IV стадии зрелости: 1-сперматозоиды, 2 – метафаза сперматоцитов 1, 2 порядков, 3 – телофаза сперматоцитов 1, 2 порядков, увеличение 400х, б) переходный участок гонады интерсекса, возраст 1+: видны резорбирующиеся ооциты на 1, 2 и 3 ступенях фазы протоплазматического роста ооцитов – 1, размножающиеся сперматогонии и сперматоциты в межовариальных пространствах и в формирующихся цистах в межовариальных пространствах – 2, (иммерсия МТ и 3мгМТ_{гип.}/кг корма), увеличение 100х, в) сперматогенный синцитий между сперматогониями разных порядков и сперматоцитами, возраст 1+, 1 – сперматогонии и сперматоциты разных порядков в процессе деления, 2 – синцитий. Увеличение x1000 с иммерсией

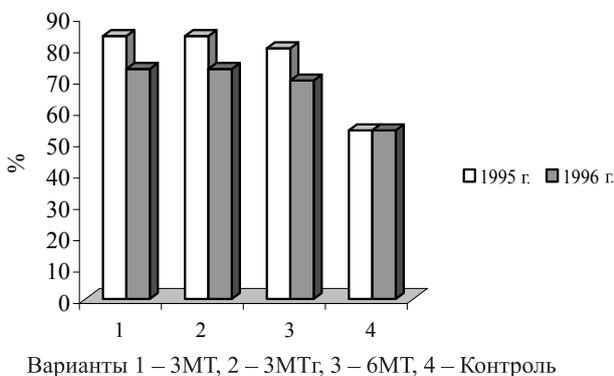


Рис. 19. Выход самок в потомстве реверсантов в Калининградской области

Количество самок в потомстве зависело, скорее всего, от наследственности производителей, рисунок 9, таблица 2. Возможно, вмешательство в нормальное развитие особи с использованием андрогенов вызывает проявление вторичных половых признаков самцов, как наиболее «экономный» путь физиологической реализации особи в сложных, искусственно созданных условиях при воздействии аналогами тестостерона. Поэ-

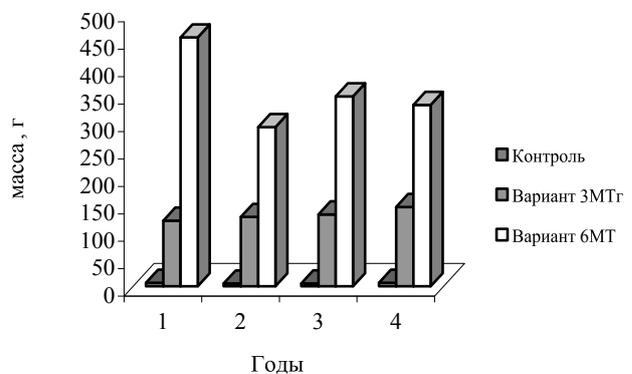


Рис. 20. Прирост потомства реверсантов у форели в Калининградской области

тому исследование нормы реакции организмов рыб, под влиянием андрогенов, на цитологическом (Метальникова, Манохина, Ананьев, 1999) и генетическом (Devlin, McNeil, Groves, Donaldson, 1991; Choy, Shao, 1996) уровнях особенно актуально при внедрении методов искусственной реверсии пола в проблему сохранения биоразнообразия объектов аквакультуры существующих и исчезающих видов рыбы.

Заключение

На основании проведенных экспериментальных и производственных исследований был выявлен общий механизм реверсии вторичных половых признаков у рыб под влиянием андрогенов на

физиологическом и, как результат этого, гистологическом уровнях. Вероятнее всего, механизм, не оказывающий прямого воздействия на генетическое определение пола. Потомство реверсантов имеет хорошее выживание и высокий темп роста за счет того, что в нем преобладают самки.

Литература

- Инрыбпром-2000/ВНИРО-2000.
- Баранникова И. А. 1969. Современное состояние метода гормональной стимуляции созревания рыб и его значение для рыбоводства // Современное состояние метода гипофизарных инъекций. Астрахань. С. 5–21.
- Баранникова И. А., Баюнова Л. В., Гераскин П. П., Семенова Т. Б. 2000. // Вопросы ихтиологии. Т. 40-2. С. 269–274.
- Гербильский Н. Л. 1947 // Тр. лаб. основ рыбоводства. Т. 1. С. 25–95.
- Гербильский Н. Л. 1949. Экспериментальные и методические основы развития осетроводства в низовьях Куры // Тр. лаб. основ рыбоводства. Т. II. С. 5–28.
- Гомельский Б. И. 1985. Гормональная инверсия пола у карпа *Surginus carpio* L. // Онтогенез-16 № 4. С. 398–405.
- Ковалев К. В., Купченко С. А., Дума В. В., Дума Л. Н., Пономарева Е. Н., Рекубратский А. В. 2008. Гормональная регуляция пола у осетровых рыб. // Тез. докл. Межд. конф. памяти В. С. Кирпичникова «Генетика, селекция, гибридизация, племенное дело и воспроизводство рыб», Санкт-Петербург, 10–12 сентября 2008 г. Санкт-Петербург: ГосНИОРХ. С. 98–100.
- Максимович А. А. 1987. Нейросекреторная гипоталамо-гипофизарная система костистых рыб. // Вопросы ихтиологии-2703. С. 390–403.
- Метальникова К. В. 1987. Результаты воздействия тестостерон-пропионата на молодь радужной форели *Salmo gairdneri* (G) // Генетические исследования морских гидробионтов. М.: ВНИРО. С. 156–164.
- Метальникова К. В. 1989а. О влиянии тестостерон-пропионата на некоторые биологические показатели лососевых рода *Salmo* и гибрида бестера *Huso huso* x *Acipenser Ruthenus*. // Современные проблемы рыбохозяйственных исследований – М.: ВНИРО. С. 89–99.
- Метальникова К. В. 1989б. Применение метода гормонально-генетической регуляции пола у стальноголового лосося. // Тез. докл. междунар. симп. по совр. пробл. Марикульт. в соц. стр.-х. – М.: ВНИРО. С. 198–200.
- Метальникова К. В., Бурцев И. А., Слизченко А. Г. 1989. Методические рекомендации по получению однополого женского потомства у стальноголового лосося. / М.: ВНИРО. 14 с.
- Метальникова К. В. 1992. Влияние синтетических аналогов тестостерона на передифференцировку пола у стальноголового лосося (Oncorhynchus mykiss (Walb.) / Автореферат на соиск. учен. степ. к. б. н.- М.: ВНИРО. 16 с.
- Метальникова К. В. 1995. Влияние синтетических аналогов тестостерона на гаметогенез у *Oncorhynchus mykiss* (Walb.) // Рыбное хозяйство, № 2. С. 40–42.
- Метальникова К. В. 1995. Опыт применения метилтестостерона для реверсии пола у лососевых видов рыб в Заполярье. // Матер. Совещ. по товарному форелеводству. Мурманск. – С. 48–51.
- Метальникова К. В. 1999. Совершенствование методов идентификации реверсантов по срокам цитологической передифференцировки гонад под влиянием андрогенов. Матер. Междунар. симп. «Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре». Адлер. С. 49–51.
- Метальникова К. В., Манохина М. С., Ананьев В. И. 1999. Возможности применения методов реверсии пола и криоконсервации спермы для сохранения генетического разнообразия рыб. // Рыбн. хоз. Сер.: Аквакультура. Вып. 1. 30–34 с.
- Метальникова К. В., Голубев В. А. 2000. Получение потомства форели от реверсантов в нерестово-вырастном хозяйстве «Прибрежное» (Калининградская обл.) // Рыбное хоз. Сер. «Пресноводная аквакультура» ВНИЭРХ. Вып. 4. С. 19–24.
- Метальникова К. В., Анохина В. С., Ананьев В. И. 2000. Криоконсервация спермы реверсантов форели. // Матер. докл. научно-практ. конф. 25–27 октября 2000 г., г. Мурманск «Марикультура северо-запада России». Мурманск. С. 33–34.
- Метальникова К. В. 2002. Предварительные результаты исследования форели из 2-го поколения от самца, обработанного метилтестостероном. // Экологическая физиология и биохимия рыб в аспекте продуктивности водоемов. Труды ВНИРО / под ред. д. б. н. Микодиной Е. В. М.: ВНИРО. Т. 141–129–137 с.
- Метальникова К. В., Привезенцев Ю. А. 2009. Способ получения многократно использованных реверсантов у рыб. / Патент № 022364, рег. № 2009116285 от 30.04.2009 г.
- Роскин Г. И., Левинсон Л. Б., 1957. Микроскопическая техника. / М.: Советская наука. 467 с.
- Строганов Н. С. 1962. Методики определения дыхания у рыб. // Руководство по исследованию физиологии рыб. С. 35–81.
- Шентякова К. В. 1986. Влияние стероидных гормонов на баланс энергии молоди стальноголового лосося. // Тез. докл. на совещ. 15–17 апреля 1986 г. в г. Суздаль-М. С. 73.

Яковлева И. В. // Тр. лаб. основ рыбоводства. Т. 2–1949. С. 167–182.

Bye V.J.et.al. Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) // *Aquaculture*, 1986-57. P. 35–50.

Choy L.Hew, Shao J. Du // United States Patent-Patent Number 5,480,774-Date of Patent Jan.2, 1996. 36 p.

Devlin Robert H, B. Kelly McNeil and T. David D. Groves, Donaldson Edward M. 1991. Isolation of a Y-Chromosomal DNA Probe Capable of Determining Genetic Sex in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsca*). // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 48. P. 1607–1612.

Gorshkov S.A. ET al. // *The Rainbow Trout. The proceeding of the first aquaculture sponsored*

Symposium held at the Institute of Aquaculture. University of Stirling. Scotland 4–7 September 1990 / Ed. by G.A. Gall. USA, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1992. P. 99–100.

Kimberg K., Christiansen T., Bjerregaard P. And Korsgaard. G-glutamyl transpeptidase, as a possible marker of sertoli cells in testes of fish. // *Fish Physiology – materials of simposium in Bergen, 1999. France, 1999. P. 387.*

Metalnikova K.V. 2008. Methods for obtaining sex reversants in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Hybrid F2) and histogenesis in salmon reversants in response to androgens. // *Actual status and active protection of sturgeon fish populations endangered by extinction / Ed. Ryszard Kolman, Andrzej Kapusta-Olsztyn. P. 113–126.*

HISTOGENESIS IN RESPONSE TO ANDROGENS IN *ONCORHYNCHUS MYKISS* (WALBAUM) AND *HUSO HUSO* X *ACIPENSER RUTHENUS* (HYBRID F₂)

K.V. Metalnikova

*Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography, Moscow, Russia,
e-mail: ksenia@vniro.ru*

Histogenesis in salmon reversants in different climatic zones in response to androgens was studied. Reversion of secondary sexual characteristics in trout, steelhead and bester was received in Russia during 1978–1996. It provided a higher content of hemoglobin in blood and an increased survival level in fish, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Hybrid F₂), compared with the control. Observed changes in the gonads of fishes under experiment resulted from intensive metabolism. Androgens were shown to be responsible for the following common changes in the gonads of treated fishes: a) accelerated development of ovaries in the females under experiment compared with the control, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* (Hybrid F₂); b) degenerated oocytes and development of testis; c) normal development of testis but permeated with blood vessels. Processes of sex reversion in fishes treated with testosterone

analogues were continued after the treatment had been over. Various reversants from salmon females produce variable number of females (in offspring) from 60 to 100%. It may depend on the genetic peculiarities of sex reversants. Mature reversants are used for crossing with ordinary females intravitaly. Histological studies of gonads were used for predicted output of sex reversants. The same reversants are used during several years. Methods of visual diagnostics of external characteristics of sex reversants were used when selecting spawners. Offsprings (mainly females) of *O.mykiss* reversants were received twice during two years. The offspring was not treated with androgens. Artificial interference into the normal development of females by means of androgens is likely to provoke the manifestation of male sexual secondary symptoms as the most rational way of physiological realization of individual females under unfavorable environmental conditions in response to testosterone analogues.

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ЛАКТАТ-ОКИСЛЯЮЩИЙ КОМПЛЕКС И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА КЛЕТОК (ОБЗОР)

О. В. Мещерякова, М. В. Чурова, Н. Н. Немова

*Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: mesch@krc.karelia.ru*

Интенсификация анаэробного синтеза АТФ является одним из важнейших механизмов регуляции энергетического обмена клеток при различных физиологических состояниях и приспособлении к изменению условий окружающей среды. Активизация гликолиза во многих клетках организма происходит в условиях, сопровождающихся дефицитом АТФ, который может возникать в результате: высокой скорости потребления АТФ и/или снижения уровня аэробного синтеза АТФ. В настоящее время в результате постоянного изменения условий среды и неблагоприятного воздействия антропогенных факторов в клетках различных органов и тканей животных наблюдается усиление анаэробного гликолиза, что является компенсаторной реакцией, направленной на поддержание уровня энергетического обмена в условиях снижения интенсивности процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток. Снижение уровня аэробного синтеза АТФ в клетках различных органов и тканей возможно при действии различных факторов, например: при снижении поступления кислорода в клетки, вызванном различными причинами, например – гипоксией, при нарушении структуры и функций митохондрий, при ингибировании активности ферментов окислительного фосфорилирования токсическими веществами, при действии на митохондрии разобщающих агентов, при развитии различных патологических процессов. Молочная кислота, образующаяся в избытке при интенсификации процесса анаэробного гликолиза, впервые была обнаружена Я. Берцелиусом в 1808 г. Позднее, в 1891 г. Араки показал в эксперименте, что количество лактата в мышцах после физической нагрузки пропорционально ее силе. С этого момента сложились первые представления

о роли лактата, как о конечном продукте анаэробного обмена в мышцах. Однако исследователям того времени лактат представлялся «ненужным клеточным отходом», пока лаборатория Кори не продемонстрировала возможность обратного превращения этого соединения в глюкозу в клетках печени. Современные исследования определили молочную кислоту новое место и роль в метаболизме – это активный системный метаболит, мигрирующий внутри клеток, между клетками и между органами, способный использоваться не только для ресинтеза глюкозы, но и вовлекаться в энергетический обмен клеток, в том числе, непосредственно окисляясь в митохондриях. Способность клеток различных органов утилизировать лактат в значительной степени определяет допустимый уровень анаэробного обмена, а следовательно, обуславливает относительную резистентность организма и его способность приспособливаться к изменению параметров среды.

Пути метаболизма молочной кислоты в организме

Наибольшие количества лактата в организме высших животных образуются в миоцитах гликолитических (синонимы: белые, быстрые, фазовые) поперечнополосатых мышечных волокон при субмаксимальной нагрузке. Гликолиз протекает также в эритроцитах, лейкоцитах, в клетках мозгового вещества почек и нервной ткани. Для поддержания нормального уровня рН избыточные количества молочной кислоты должны устраняться из клетки (Poole, Halestrap, 1993).

Существуют два пути устранения лактата: во-первых, образующийся лактат способен частично окисляться в тех же самых клетках, где он

образуется, это – так называемый – эндогенный лактат. Обычно это происходит в период снижения интенсивности анаэробных процессов и усиления аэробного метаболизма. Во-вторых, избыточные количества лактата выделяются клетками в межклеточное вещество и поступают в кровь. Большая часть молочной кислоты поглощается клетками других типов или других органов, имеющих высокую способность к его окислению. Лактат, поступающий в клетки из межклеточного вещества или крови, называется – экзогенным. Движение молочной кислоты между клетками и межклеточным веществом происходит благодаря существованию механизма межклеточного лактатного шунта (cell-cell lactate shuttle – CCLS).

К клеткам способным метаболизировать не только собственный – эндогенный, но также и экзогенный лактат относятся прежде всего – гепатоциты, кардиомиоциты, нейроны и миоциты аэробных (синонимы: красные, медленные, тонические) поперечнополосатых мышечных волокон, (Ketchum et al., 1988; Hashimoto, Brooks, 2008; Laughton et al., 2007; Hertz, Diemel, 2002; Juel, 2001). Однако, количество экзогенного лактата, поступающего в эти клетки, строго контролируется и определяется, прежде всего, необходимостью регуляции внутриклеточного рН. Это в свою очередь зависит от количества собственного – эндогенного лактата и скорости метаболических процессов, в которых утилизируется это соединение. Дальнейшая судьба лактата в клетках, способных поглощать экзогенный лактат зависит от особенностей их метаболизма и выполняемой функции. Большая часть лактата (75–80% лактата, образуемого в мышцах) поступает в клетки печени и почек и там включается в глюконеогенез. Другая часть экзогенной молочной кислоты включается в энергетический обмен кардиомиоцитов, нейронов и миоцитов красных волокон скелетных мышц. В настоящее время с использованием самых современных биохимических, иммуногистохимических, радиоизотопных и др. методов для клеток скелетных мышц, сердца и нейронов доказано существование внутриклеточного лактатного шунта (intracellular lactate shuttle – ILS), с помощью которого, лактат экзо-, а также эндогенного происхождения способен транспортироваться в митохондрии этих клеток и там подвергаться окислению. Доказано существование митохондриальной ЛДГ, а также белков-транспортёров лактата не только на клеточных, но и на митохондриальных мембранах (Hashimoto, Brooks, 2008;

Hashimoto et al., 2008; Lemire et al., 2008; Laughton et al., 2007; Schurr, Payne., 2007). Под действием мембраносвязанной митохондриальной ЛДГ, лактат, поступающий в митохондрии, превращается в пируват, который затем окисляется в цикле Кребса с образованием 18 молекул АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

Межклеточный транспорт лактата

Типы белков-переносчиков лактата, их структура и свойства

Межклеточный транспорт лактата осуществляется с помощью специальных белков-транспортёров. Они называются – монокарбоксилатные переносчики (monocarboxylate transporters – MCTs) и представляют собой семейство генетически-родственных белков, различающихся аминокислотной последовательностью и кинетическими свойствами. Впервые, белок, ответственный за транспорт лактата был выделен из эритроцитов и назван MCT-1. Было установлено, что это – полипептид с молекулярной массой у шпорцевой лягушки 35–45 кДа, у кролика и морской свинки 40–50 кДа, (Poole, Halestrap, 1992, 1994). Позже была установлена аминокислотная последовательность этого белка, выделенного из эритроцитов человека, крыс и мышей (Garcia et al. 1994b; Jackson et al. 1995; Carpenter et al. 1996). Интенсивное изучение субстратов, кинетических свойств и ингибиторов транспорта монокарбоксилатных соединений, а также открытие второго переносчика (MCT-2) в кардиомиоцитах шпорцевой лягушки, крыс и человека (Poole, Halestrap, 1993; Halestrap et al. 1997; Lin et al., 1998) позволило исследователям сделать предположение о существовании целого семейства таких переносчиков. В дальнейшем у цыпленка был идентифицирован MCT-3 (Philp et al. 1995; Yoon et al. 1997; Yoon & Philp, 1998), а у человека и крыс помимо MCT-1, 2 были открыты транспортёры 4, 5, 6, 7 типа (Wilson et al. 1998). Был открыт также MCT-8 у человека (Price et al. 1998; Wilson et al. 1998) и мыши (Debrand et al. 1998). Поиски новых форм монокарбоксилатных транспортёров продолжаются, гомологи этих белков были обнаружены у дрозофилы *Drosophila melanogaster*, свободноживущей нематоды *Sulpholobus sulfataricus*, дрожжей *Sulpholobus sulfataricus*, кишечной палочки *Escherichia coli* и даже у архебактерий *Sulpholobus sulfataricus* (Price et al. 1998), что

свидетельствует об их важной роли в метаболизме и раннем эволюционном происхождении. На сегодняшний день известно уже 14 изоформ МСТ, изучен их аминокислотный состав, свойства и роль в метаболизме некоторых органов и тканей (Halestrap, Price, 1999; Halestrap, Meredith, 2004).

На основании данных об аминокислотных последовательностях монокарбоксилатных транспортеров Пуле и Хэлестрэпом была предложена модель их пространственной организации (Poole et al. 1996; Poole & Halestrap, 1997) (рис. 1). Все МСТs имеют 10–12 связанных между собой трансмембранных петлеобразных доменов с внутриклеточными С- и N-концевыми участками полипептидной цепи и большой петлей между 6 и 7 сегментами, обращенной внутрь

клетки. Предполагается, что две половинки молекулы переносчика дифференцированы по своим функциям (Saier, 1994). N-конец полипептидной цепи с участками 1–6 петель проявляет высокую консервативность для всех транспортеров, вероятнее всего эта часть молекулы отвечает за энергетическое сопряжение (через транспорт ионов H^+ или Na^+), прикрепление к мембране и/или поддержание структурной конформации. С-концевой участок молекулы с петлями 7–12 менее консервативен и различается у разных типов транспортеров, предполагается, что он отвечает за субстратную специфичность. Например, замена аминокислоты Фен₃₆₀ на Цис в 10 сегменте МСТ-1 приводит к смене субстрата с лактата на мевалонат (Kim et al. 1992; Garcia et al. 1994a).

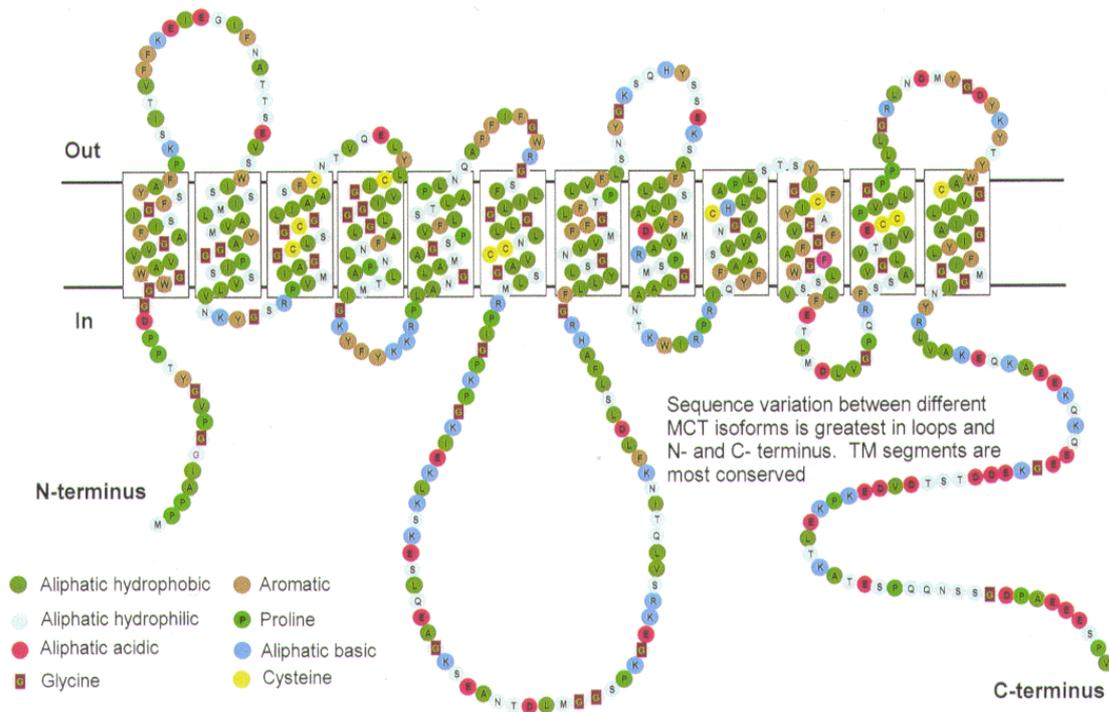


Рис. 1. Модель предполагаемой структуры семейства монокарбоксилатных переносчиков (Juel, Halestrap, 1999)

На основании степени совпадения первичной структуры сделаны выводы о генетическом родстве изоформ. В обзоре (Halestrap, Price, 1999) подробно описаны все известные монокарбоксилатные транспортеры про- и эукариот, хромосомная локализация кодирующих их генов и предложена схема их генетического родства. Наиболее родственными изоформами являются МСТ-1 и 2. Их структуры совпадают на 60% (Garcia et al. 1995; Wilson et al. 1998). Первичная структура МСТ-3 совпадает со структурой

МСТ-1 на 53% (Philp et al. 1995; Yoon et al. 1997; Yoon & Philp, 1998). Совпадение структур транспортеров 1 и 4 типа составляет 37%. Транспортеры МСТ-5, 6, 7 идентичны МСТ-1 всего лишь на 30–40%. Структуры МСТ-1 и 8 совпадают менее чем на 30%.

Изучены субстраты, субстратная специфичность и ингибиторы для различных типов МСТs (Carpenter & Halestrap (1994); Juel (1997), Lin et al., 1998; Bröer et al. (1998) Bröer et al. (1999). Установлено, что субстратами для монокарбок-

силатных переносчиков помимо лактата, являются и другие соединения – ацетат, пропионат, бутират, галогенпроизводные различных монокарбоксилатных соединений, пируват, 2-оксибутират и ацетоацетат. МСТs различаются по своей специфичности к тем или иным субстратам (Juele, Halestrap, 1999). Наиболее высокую субстратную специфичность к лактату проявляют МСТ-1, 2 и 4, что подтверждается также их сильным генетическим родством. Транспортёры МСТ-3, 5, 6, 7 имеют более низкую субстратную специфичность по отношению к лактату, а МСТ-8 вообще не участвует в транспорте лактата. Ряд соединений оказывает ингибирующее влияние на транспорт лактата через переносчики того или иного типа, это – замещенные монокарбоксилаты (α -циано-4-гидроксициннамат, фенилпируват и др.), замещенные дисульфонаты (5-нитро-2-(3-фенилпропиламино)-бензоат и др.), лизиновые, аргининовые и сульфгидрильные реагенты и другие соединения.

Тканевая дифференциация различных изоформ МСТs

Показано (Bonen et al., 2006), что различные изоформы МСТs, идентифицируются в клетках многих органов, однако тканеспецифичность экспрессии различных изоформ и кинетические свойства еще до конца не изучены. Известно, что мембраны эритроцитов содержат преимущественно МСТ-1 (Poole et al., 1996), который является самым распространенным транспортёром, он обнаружен на мембранах клеток практически всех органов многих высших животных (Halestrap, Price, 1999). Мембраны лейкоцитов содержат большое количество МСТ-4 (Halestrap, Price, 1999). В кардиомиоцитах обнаружены МСТ-1, 2 и незначительные количества транспортёров 6 и 8 типа (Halestrap et al., 1997; Halestrap, Price, 1999; Brooks et al., 1999; Bonen et al., 2006). На клеточных мембранах гликолитических (синонимы: белые, быстрые, фазовые) поперечнополосатых мышечных волокон млекопитающих и человека идентифицируются, главным образом, МСТ-4, а клетки аэробных (синонимы: красные, медленные, тонические) поперечнополосатых мышечных волокон экспрессируют большое количество МСТ-1 (Bonen et al., 1997; Brooks et al., 1999; Juele, Halestrap, 1999; Juel, 2001; Bergersen, 2007). Было установлено также, что количество МСТ-1 в мышечных клетках прямо пропорционально количеству митохондрий (Halestrap, Price, 1999). В скелетных мышцах грызунов и человека встречаются так-

же изоформы МСТ-5, 6, 7 и 8 но в меньших количествах (Bonen et al., 2006). В печени преобладают транспортёры 2 типа (McClelland et al., 2003), в плаценте – 5 и 6, в почках – 1, 2, 6 и 8, в поджелудочной железе – 7 типа (Garcia et al., 1995; Halestrap, Price, 1999). Межклеточные монокарбоксилатные транспортёры идентифицированы во многих субструктурах головного мозга крыс и человека, но наибольшее их количество обнаружено на мембранах нейронов и представлено типом МСТ-2. В астроцитах и эпителиальных клетках кровеносных сосудов головного мозга экспрессируются преимущественно МСТ-1 и МСТ-4 (Hertz, Dienel, 2005). В ретине глаза цыпленка были идентифицированы МСТ-1, 4 и высоко специфичный МСТ-3 – исключительно в ее эпителиальных клетках (Philp et al., 1995; Yoon et al. 1997; Yoon & Philp, 1998). В ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* L. был обнаружен МСТ-4 (Juel, Halestrap, 1999). В сперматозоидах мышей в области головки идентифицирован МСТ 1 типа, а в области хвоста – 2 типа (Garcia et al., 1995).

Направление и кинетические параметры транспорта лактата на межклеточном уровне и в системе целого организма

На сегодняшний день наиболее изучены кинетические параметры межклеточного транспорта лактата переносчиками МСТ-1, 2 и 4 в клетках мышц и головного мозга крыс и человека (на водных организмах таких работ не проводилось). Первые работы в этом направлении были проведены на миоцитах скелетных мышц и сердца (Juel, 1997; Juel & Pilegaard, 1998; Wilson et al. 1998; Juele, Halestrap, 1999). Установлено, что МСТ-4, синтезирующийся в большом количестве на клеточных мембранах гликолитических скелетных мышечных волокон млекопитающих и человека, осуществляет перенос лактата преимущественно из клеток в межклеточное вещество. Этот транспортёр имеет самое низкое сродство к лактату, и насыщается только при очень высоких концентрациях лактата. Его Константа Михаэлиса-Ментен для лактата (K_m_{Lac}) равна 20–40 мМ), что позволяет регулировать интенсивность потока выведения лактата через него в очень широких пределах, не прибегая к значительному увеличению количества самих переносчиков. Выводимая в межклеточное вещество молочная кислота способна на первом этапе поглощаться соседними клетками – аэробными миоцитами скелетных мышц, в клетки которых она попадает через МСТ-1. Излишние ко-

личества молочной кислоты из межклеточного вещества скелетных мышц поступают в кровь и уже из крови усваиваются преимущественно кардиомиоцитами и гепатоцитами, в клетки которых она попадает через МСТ-1 и МСТ-2 (García et al., 1995). Эти типы переносчиков в данных типах клеток осуществляют движение лактата, главным образом, внутрь клетки. Количество молочной кислоты, поступающее через них в клетки, ограничено из-за их быстрой насыщаемости, особенно МСТ-2, так как, он имеет самое высокое сродство к лактату ($Km_{Lac} = 0,7$ мМ). МСТ-1 имеет промежуточное значение сродства к лактату, его Km_{Lac} равна 5 мМ. Таким образом, главным регулирующим механизмом поступления экзогенного лактата в клетки красных мышц, сердца и печени является количество переносчиков 1 и 2 типа, сосредоточенных на мембранах этих клеток. Наибольшее количество переносчиков этого типа обнаружено на мембранах гепатоцитов, что обуславливает потребление ими наибольшего количества молочной кислоты из притекающей крови.

При активизации работы мозга значительно возрастает уровень анаэробного обмена и образования молочной кислоты в норме с 1 до 3 мМ, а при патологии – до 10 мМ (Dienel and Hertz, 2001; Dienel and Cruz, 2003, 2004). С 1998 г. предполагалось, что избыток лактата, образующийся главным образом в астроцитах, может транспортироваться в нейроны и включаться в их энергообмен, однако по поводу интенсивности такого транспорта между учеными шли серьезные дебаты (McKenna et al., 1998; Magistretti et al., 1999; Dienel and Hertz, 2001; McKenna et al., 2001; Chih and Roberts, 2003; Pellerin and Magistretti, 2003; Debernardi et al., 2003; Dienel and Cruz, 2003, 2004; Hertz, 2004). Подробное изучение транспортной кинетики МСТs клеток головного мозга Хертцом и Диенелом (Hertz, Dienel, 2005) подтвердило этот факт, однако показало, что во время значительной активации анаэробного обмена в субструктурах головного мозга и снижении нейроны могут усвоить только часть образующегося лактата, оставшееся количество поступает в кровь и удаляется из головного мозга. При снижении уровня анаэробного обмена нейроны способны усваивать лактат, образующийся не только в астроцитах, но и поступающий из общего кровотока. При исследовании транспортной кинетики лактата в различных типах клеток головного мозга было установлено, что на мембранах астроцитов идентифицируются МСТ-1 и МСТ-4,

имеющие низкое сродство к лактату (Km_{Lac} равна, соответственно 3–5 и 15–30 мМ) и не насыщающиеся при физиологических концентрациях лактата. Это способствует неограниченному удалению лактата из них даже при ненормально высоких его концентрациях. Транспортёр МСТ-2, экспрессирующийся в нейронах осуществляет транспорт молочной кислоты только внутрь клетки. Он имеет очень высокое сродство к лактату ($Km_{Lac} = 0,6–0,7$ мМ) и уже при физиологическом уровне молочной кислоты в 3 мМ насыщается на 80% и почти достигает своей максимальной скорости, что регулирует поступление молочной кислоты в нейроны, поддерживает их гомеостаз и защищает от поступления высоких (патологических) концентраций лактата. При увеличении количества транспортеров 2 типа на мембранах нейронов значительно возрастает и количество окисляемого лактата в них.

При изучении монокарбоксилатных транспортеров в ретине глаза было описан аналогичный механизм (Halestrap, Price, 1999; Nehlig, Coles, 2007). С помощью МСТ 1 типа лактат способен перемещаться в пределах различных типов клеток ретины. МСТ-2 с высоким сродством к лактату осуществляет преимущественно его транспорт из глиальных клеток во внутрь нейронов, а специфический МСТ-3 обнаруженный исключительно на мембранах эпителиальных клетках ретины осуществляет удаление избыточных количеств молочной кислоты в микрокапилляры. Исследователи считают, что совместное функционирование МСТs 1 и 3 типа играет дополнительную роль, регулируя осмотическое давление внутри ретины, так как было обнаружено, что транспорт лактата в этой структуре сопровождается переносом воды (Zeuthen, 1996).

Таким образом, соотношение количества различных типов переносчиков, различающихся по своим кинетическим свойствам, на мембранах клеток различных тканей и органов является фактором, регулирующим интенсивность и направление метаболизма лактата между клетками различных типов, между клетками и кровью, между кровью и органами, то в системе всего организма в целом.

Окисление лактата в митохондриях клеток

Как было сказано выше, некоторая часть эндо- и экзогенного лактата способна проникать в митохондрии клетки и там окисляться, включаясь в процесс окислительного фосфорилиро-

вания. Предположения о возможности митохондриального окисления лактата существовали очень давно, однако только в последние годы детально был раскрыт механизм этого процесса.

В 1972 году Скиллетер и Кун (Skilleter, Kun, 1972) используя полярографический метод одними из первых показали, что митохондрии, выделенные из печени крыс, способны окислять лактат. Впоследствии, было показано, что окисление лактата у крыс может происходить также в митохондриях сердца (Ким и др., 1990) и скелетных мышц (Szczesna-Kaczmarek, 1990). При этом было установлено, что процесс окисления лактата в митохондриях активируется добавлением лактата, НАД⁺ и сопровождается увеличением поглощения кислорода, которое регулировалось АДФ и неорганическим фосфатом. Митохондриальное окисление лактата ингибировалось специфическим ингибитором ЛДГ – оксаматом, а также ингибиторами электронтранспортной цепи митохондрий (ротенон, антимицин А, цианид калия). Одновременно с изучением процесса окисления лактата в митохондриях, многими исследователями (Marcolette et al., 1970; Skilleter, Kun, 1972; Ayub Khan, 1973; Усатенко и др., 1973, 1974; Coleman et al., 1976; Lluís, 1985; Sagrista, Bosal, 1987; Prunonosa et al., 1989; Javed et al., 1990; Brooks et al., 1999) активно велись работы по изучению самой митохондриальной ЛДГ (мЛДГ): ее изоферментного состава, тканеспецифичности, свойств, локализации и др. вопросов. Было обнаружено, что мЛДГ локализуется в митохондриях в межмембранном пространстве и связана непосредственно с наружной стороной внутренней мембраны (Skilleter, Kun, 1972). Митохондриальная ЛДГ была обнаружена в клетках многих органов, таких как печень, мышцы, сердце, костной и нервной ткани (Marcolette et al., 1970; Усатенко и др. 1973 и 1974; Hanker et al., 1977; Javed et al., 1990; Brooks et al., 1999). Электрофорез в геле и электронная микроскопия органов крысы (Brooks et al., 1999) показала, что распределение мЛДГ тканеспецифично. В митохондриях сердца обнаружены изоферменты ЛДГ-1 (H4) и ЛДГ-5 (M4), но преобладают ЛДГ-1. В митохондриях печени и красных мышц была наиболее активна изоформа ЛДГ-5. Джавед с сотр. (Ayub Khan, 1973; Javed et al., 1990) выделил и отчистил митохондриальную форму ЛДГ из клеток печени кролика и сравнил ее свойства с цитоплазматической формой. Удельная активность митохондриальной и цитоплазматической форм

составляла, соответственно, 9,76 и 25,69 ед/мг белка, а K_m_{Lac} соответственно, 165 и 20 ммоль. рН-оптимум для обеих изоформ составлял 8,5; они ингибировались пируватом и НАДН.

В настоящее время установлено, что окисление лактата в митохондриях осуществляется митохондриальным лактат-окисляющим комплексом (mitochondrial lactate oxidation complex, mLOC) (рис. 2). Впервые, существование этого комплекса было доказано для клеток скелетных мышц (Hashimoto et al., 2006; Hashimoto, Brooks, 2008). Было установлено, что он состоит из мембраносвязанной митохондриальной ЛДГ, цитохром с оксидазы, белка-транспортера лактата МСТ-1 и его шаперона ОХ-47 (CD-147), контролирующем его экспрессию. Пируват, образующийся при окислении поступающего в митохондрии лактата, переносится в матрикс митохондрий с помощью МСТ-1 и там окисляется в цикле трикарбоновых кислот (ТКА). Митохондриальная ЛДГ (mLDH) сосредоточена на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий и ассоциирована с цитохром с оксидазой (СОХ), что обеспечивает сопряжение эндогенной реакции окисления лактата с экзогенным изменением редокс-потенциала в электронтранспортной цепи митохондрий при окислении цитохрома с.

Позднее существование митохондриального лактат-окисляющего комплекса было доказано также и для клеток головного мозга (Hashimoto et al., 2008). Методом иммуногистохимического анализа мозга крысы продемонстрировано, что МСТ-1, МСТ-2, мЛДГ и ЦО совместно локализуются внутри митохондрий нейронов головного мозга. Методом иммуноблоттинга после иммунопреципитации показано, что эти 4 компонента осаждаются также вместе. Обнаружено также, что МСТ-2 и мЛДГ коэкспрессируются в митохондриях культуры нейронов. Лемье с сотр. (Lemire et al., 2008) с помощью электрофореза и флуоресцентной микроскопии выявил наличие ЛДГ в митохондриях клеток мозга человека, а с использованием ¹³С-ЯМР анализа и жидкостной хроматографии были идентифицированы продукты ЦТК и АТФ в митохондриях астроцитов человека после их инкубации с лактатом. Полученные сведения подтверждают, что митохондриальный лактат-окисляющий комплекс (mLOC) нервных клеток служит механизмом утилизации лактата, эндо- и экзогенного происхождения и демонстрируют адаптивность мозга в манипуляциях своим «энергетическим бюджетом».

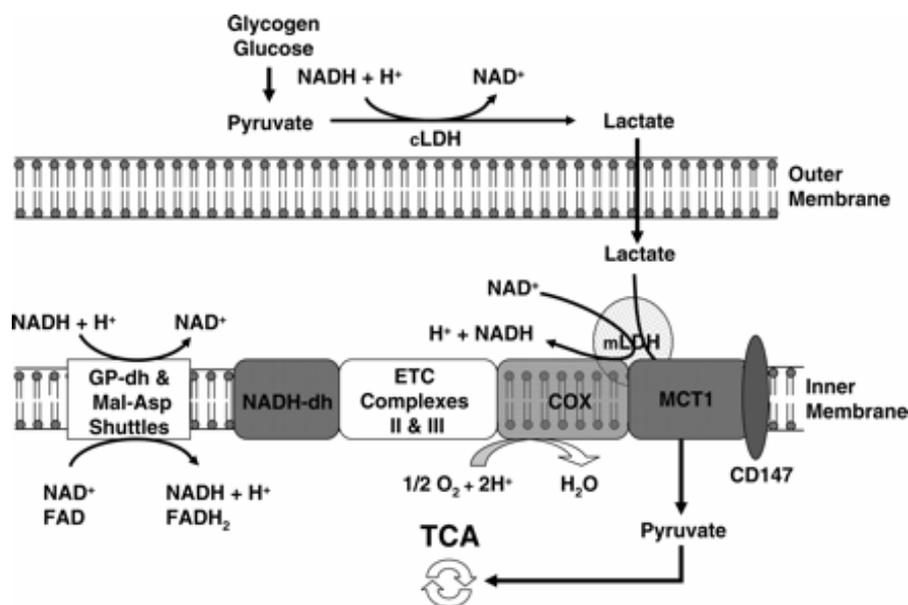


Рис. 2. Структура митохондриального лактат-окисляющего комплекса (Hashimoto et al., 2008)

Брукс и Хашимото (Brooks, 2000; Hashimoto, Brooks, 2008), считают, что фактором регулирующим скорость процесса окисления лактата в митохондриях является уровень молочной кислоты в клетке. По их мнению, молекула лактата является некой «сигнальной молекулой», специальным «гормоном» или как они называют ее – «лактормоном» (от англ. «lactormone»), которая вызывает адаптивные перестройки метаболизма лактата в митохондриях, за счет активации экспрессии генов синтеза митохондриального белка-транспортера лактата, митохондриальной ЛДГ и цитохромоксидазы. Считается, что перемещение лактата в митохондрии и аллостерическая модуляция скорости фосфорилирования – это пример быстрой регуляции метаболизма, в то время как транспорт лактата через клеточную мембрану в другие структуры и увеличение числа межклеточных транспортеров – это длительный адаптационный механизм. Таким образом, перемещение лактата в митохондрии и окисление его там является предпочтительным и первоочередным, по сравнению с транспортом лактата из клетки и уровнем окисления лактата в митохондриях является фактором, регулирующим скорость выделения лактата из клетки.

Способность митохондрий к окислению лактата является важнейшим адаптивным механизмом регуляции энергообеспечения клеток многих органов как в норме, так и при патологии. В частности, обнаружено усиление митохондриального окисления лактата при интенсивном развитии нервной системы, голодании, при физической нагрузке. Особое значение этот про-

цесс имеет для клеток головного мозга, где может значительно активизироваться процесс анаэробного синтеза АТФ. Например, Канис с соавт. (Canis et al., 2008) в экспериментах на мозге крыс обнаружил, что при экспериментальной гипергликемии усиливается местный транспорт глюкозы в нервную ткань и ее окисление астроцитами с образованием лактата. Методом иммуноавтордиографии было показано значительное увеличение плотности МСТ-1 на 10–24% в астроцитах, а также эндотелиальных клетках и МСТ-2 в нейронах головного мозга. При этом, увеличение плотности переносчиков лактата коррелировало с увеличением уровня окисления глюкозы в астроцитах головного мозга.

Из всего сказанного следует что, активность мембраносвязанной митохондриальной ЛДГ и уровень митохондриального окисления лактата в клетках различных органов в значительной степени определяют адаптивные возможности тканей, органов и всего организма в целом. В связи с этим, очень актуальными являются исследования таких вопросов, как – тканеспецифичность метаболизма молочной кислоты, межвидовые, возрастные, половые различия, эволюционный и экологический аспекты, взаимосвязь с патологическими процессами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 08-04-0140_a и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» проект НК-28(12).

Литература

- Alcazar O, Tiedge M, Lenzen S. Importance of lactate dehydrogenase for the regulation of glycolytic flux and insulin secretion in insulin-producing cells. *Biochem J*. 2000 Dec 1;352 Pt 2:373-80.
- Bonen, A., Baker, S. K. & Hatta, H. (1997). Lactate transport and lactate transporters in skeletal muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology* 22, 531–552.
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H.-P., Stegen, C., Halestrap, A. P. & Deitmer, J. W. (1999). Characterisation of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical Journal*.
- Bröer, S., Schneider, H. P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B. & Deitmer, J. W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochemical Journal* 333, 167–174.
- Carpenter, L. & Halestrap, A. P. (1994). The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochemical Journal* 304, 751–760.
- Dienel G.A., Hertz L. 2001. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res* 66: 824–838.
- Dienel GA, Hertz L. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res*. 2001 Dec 1; 66(5): 824–38.
- Garcia C.K., Brown M.S., Pathak R.K., Goldstein J.L. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem*. 1995 Jan 27; 270(4): 1843–9.
- Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm of the third millennium. *J. Physiol.* 558.1, 2004, 5–30.
- Gladden, L. B. (1996). Lactate transport and exchange during exercise. In *Handbook of Physiology*, section 12, *Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*, chap. 14, ed. Rowell, L. & Shepherd, J., pp. 614–648. Oxford University Press, New York.
- Halestrap A.P., Price N.T. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343: 281–299.
- Halestrap A.P., Price N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*. 1999 Oct 15; 343 Pt 2: 281–99.
- Halestrap, A. P., Wang, X. M., Poole, R. C., Jackson, V. N. & Price, N. T. (1997). Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *American Journal of Cardiology* 80, A17–25.
- Hashimoto T., Brooks G.A. Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Med Sci Sports Exerc*. 2008 Mar; 40(3):486–94.
- Hashimoto T., Hussien R., Cho H.S., Kaufer D., Brooks G.A. Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS ONE*. 2008 Aug 13; 3(8): e2915.
- Hertz L, Dienel GA. 2002. Energy metabolism in the brain. *Int Rev Neurobiol* 51: 1–102.
- Juel C., Halestrap A. Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. *The Journal of Physiology* (1999), 517.3, pp. 633–642.
- Juel, C. (1995). Regulation of cellular pH in skeletal muscle fiber types, studied with sarcolemmal giant vesicles obtained from rat muscles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1265, 127–132.
- Juel, C. (1997). Lactate-proton co-transport in skeletal muscle. *Physiological Reviews* 77, 321–358.
- Juel, C. (1998). Muscle pH regulation: role of training. *Acta Physiologica Scandinavica* 162, 359–366.
- Magistretti P.J, Pellerin L. Functional brain imaging: role metabolic coupling between astrocytes and neurons. *Rev Med Suisse Romande*. 2000 Sep; 120(9): 739–42.
- McKenna M.C., Tildon J.T., Stevenson J.H., Hopkins I.B., Huang X., Couto R. Lactate transport by cortical synaptosomes from adult rat brain: characterization of kinetics and inhibitor specificity. *Dev Neurosci*. 1998; 20(4–5): 300–309.
- Nehlig A., Coles J.A. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia*. 2007 Sep; 55(12): 1238–50.
- Nehlig A., Coles J.A. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia*. 2007 Sep; 55(12): 1238–50.
- Philp A., Macdonald A., Watt. P. Lactate – a signal coordinating cell and system function. *J. Exp. Biology*, 208, 2005. C. 4561–4575.
- Poole, R. C. & Halestrap, A. P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology*, 1993, 264. C. 761–782.
- Poole, R. C., Halestrap, A. P. (1992). Identification and partial purification of the erythrocyte lactate transporter. *Biochemical Journal* 283, 855–862.
- Poole, R. C., Halestrap, A. P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology* 264, C. 761–782.
- Poole, R. C., Halestrap, A. P. (1994). N-Terminal protein sequence analysis of the rabbit erythrocyte lactate transporter suggests identity with the cloned monocarboxylate transport protein MCT1. *Biochemical Journal* 303, 755–759.
- Poole, R. C., Halestrap, A. P. (1997). Interaction of the erythrocyte lactate transporter (monocarboxylate transporter 1) with an integral 70-kDa membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 272, 14624–14628.
- Poole, R. C., Sansom, C. E., Halestrap, A. P. (1996). Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H⁺/lactate cotransporter (MCT1). *Biochemical Journal* 320, 817–824.

Wilson, M. C., Jackson, V. N., Heddle, C., Price, N. T., Pilegaard, H., Juel, C., Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O. F. & Halestrap, A. P. (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *Journal of Biological Chemistry* 273, 15920–15926.

Yoon, H. & Philp, N. J. (1998). Genomic structure and developmental expression of the chicken monocarboxylate transporter MCT3. *Experimental Eye Research* 67, 417–424.

Yoon, H., Fanelli, A., Grollman, E. F. & Philp, N. J. (1997). Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium.

Biochemical and Biophysical Research Communications 234, 90–94.

Zeuthen T., Hamann S., la Cour M. Cotransport of H⁺, lactate and H₂O by membrane proteins in retinal pigment epithelium of bullfrog. *J Physiol.* 1996 Nov 15; 497 (Pt 1): 3–17.

Lin R.Y., Vera J.C., Chaganti R.S., Golde D.W. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem.* 1998 Oct 30; 273(44): 28959–65.

Николлс Дж., Мартин Р., Валлас Б., Фукс П. От нейрона к мозгу: Пер. с англ. Издание 2-е. – М.: Изд-во ЛКИ, 2008. – 672 с.

MITOCHONDRIAL LACTATE OXIDATION COMPLEX AND ITS ROLE FOR CELL ENERGY HOMEOSTASIS

O.V. Meshcheryakova, M.V. Churova, N.N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: mesch@krc.karelia.ru*

Recent evidence and new line investigation, now place lactate as an active metabolite, capable of moving between cells, tissues and organs, where it may be oxidized in via mitochondrial lactate oxidation complex. Lactate is oxidized to pyruvate via mitochondrial LDH (mLDH) in association with COX. This endergonic lactate oxidation reaction is coupled to the exergonic

redox change in COX during mitochondrial electron transport. Transport of lactate across the cell and mitochondrial membrane is regulated by different types of monocarboxylate transporters (MCT). Mitochondrial lactate oxidation play an important role for cell energy homeostasis especiality in brain and muscle at different physiology conditions.

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ВКУСОВЫХ СВОЙСТВ ПИЩЕВЫХ ОБЪЕКТОВ И ЕГО ТЕМПОРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ У РЫБ С РАЗНЫМ ТИПОМ ПИТАНИЯ

Е. С. Михайлова¹, О. М. Исаева², А. О. Касумян¹

¹ МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия,
elena_mikhailova@mail.ru

² ФГНУ НИИЭРВ, Красноярск, Россия,
olga-isa2@yandex.ru

Введение

Пищевое поведение рыб представляет собой последовательную цепь разнообразных двигательных актов и реакций, заканчивающуюся схватыванием пищевого объекта и оценкой его соответствия потребностям особи. В отличие от пищевого поиска, проявление которого изучено у большого числа видов, поведение тестирования рыбами свойств схваченных объектов питания остается практически неисследованным. Известно, что большое значение в сенсорном обеспечении этого завершающего этапа пищевого поведения принадлежит внутривидовой вкусовой рецепции. Согласно имеющимся в литературе данным, рыбы часто принимают решение о заглатывании или об отказе от потребления схваченной добычи после многократных отверганий и повторных схватываний (Gill, Hart 1994, 1996). Число повторных схватываний и длительность удержаний пищевого объекта во многом связаны с образом жизни конкретного вида. В задачи настоящей работы входило изучить структуру поведенческого ответа рыб с разным типом питания на искусственные пищевые объекты с известными вкусовыми свойствами, выяснить его динамику и длительность отдельных поведенческих актов.

Материалы и методика

Эксперименты выполнены на 4 видах рыб: девятииглой колюшке *Pungitius pungitius* (6–7 см), горчаке *Rhodeus sericeus amarus* (5 см), леще *Abramis brama* (7,5 см) и линее *Tinca tinca* (8–9 см). Рыб помещали в аквариумы поодиночке и обучали схватывать подаваемые поштуч-

но гранулы, изготовленные из агар-агарового геля. В ходе каждого опыта в аквариум вносили по одной грануле и регистрировали длительность реагирования рыбы (время от падения гранулы в воду и до первого ее схватывания), длительность всех последовательных удержаний гранулы и интервалов между схватываниями. Продолжительность событий регистрировали с точностью 0,1 сек с помощью компьютерной программы VH-fish. Для каждого вида рыб были использованы гранулы, содержавшие аминокислоты, которые согласно нашим предварительным опытам, вызывали максимальное число повторных схватываний и потребление которых было близким к 50%. Для девятииглой колюшки таким веществом была аспарагиновая кислота (0,01 М), для леща – цистеин (0,1 М), линя и горчака – аланин (0,1 М). Всего выполнено 407 опытов с девятииглой колюшкой, 199 опытов с лещом, 110 с линеем и 22 с горчаком.

Результаты и обсуждение

В опытах рыбы всех исследованных видов схватывали тестируемые гранулы неоднократно, однако максимальное число таких схватываний оказалось разным. У леща в опытах зафиксировано до 16 повторных схватываний, у девятииглой колюшки – 11, у линя и горчака – 6. В большинстве опытов число схватываний было меньше. Так, горчак чаще всего заглатывал или окончательно отказывался от потребления гранулы после одного схватывания, линь после 1–2, лещ – после 2–3, а колюшка – после 1–4 схватываний (рис. 1). Почему рыба отвергает и снова схватывает тестируемую гранулу

несколько раз подряд пока не совсем ясно. Возможно, таким образом достигается лучшее восприятие вкуса предлагаемого корма. Это может быть обусловлено также быстрой адаптацией вкусовых рецепторов, затрудняющей распознавание вкусовых качеств корма (вкус – это быстро адаптирующаяся сенсорная система (Кассиль, 1972). Чем больше происходит повторных схватываний, тем более продолжителен

опыт. Для леща, горчача и девятииглой колюшки средняя продолжительность удержаний гранулы (4,1 с, 16,5 с и 2,6 с) всегда была больше средней продолжительности интервалов между схватываниями (3,1 с, 2,2 с и 0,9 с соответственно), причем во всех случаях интервалы между схватываниями были короче предшествовавшего и последующего удержания гранулы (рис. 2). И лишь для линя периоды удержания

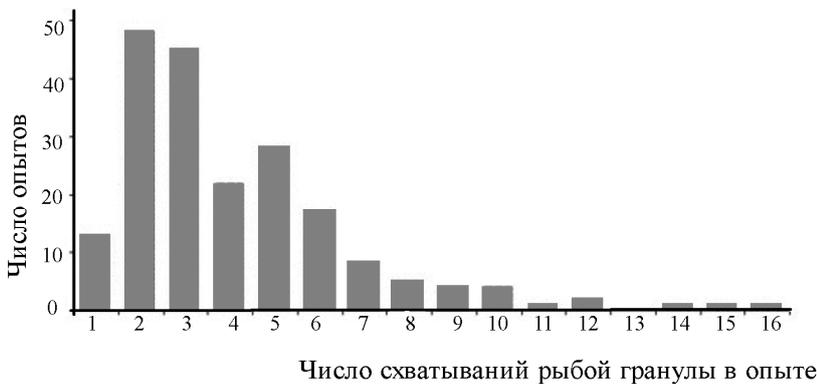


Рис. 1. Распределение опытов по числу схватываний лещом, *Abramis brama*, гранул, содержащих цистеин (0,1 М)

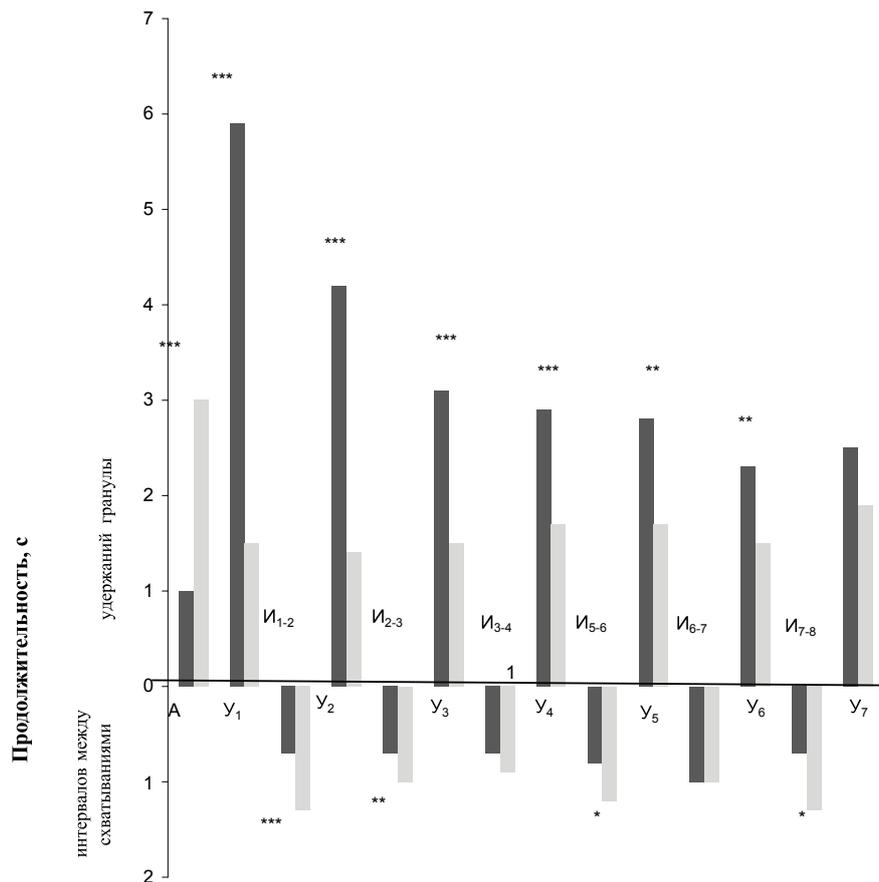


Рис. 2. Продолжительность последовательных периодов поведенческого ответа девятииглой колюшки, *Pungitius pungitius*, на гранулы с аспарагиновой кислотой (0,01 М) в опытах, закончившихся заглатыванием (темные столбцы) или отверганием гранулы (светлые столбцы)

Примечание: А – период реагирования на упавшую в воду гранулу. У1, У2, ..., У7 – продолжительность удержания гранулы после первого, второго, ..., седьмого схватывания гранулы, соответственно. И1-2, И2-3, ..., И6-7 – продолжительность интервалов между соответствующими схватываниями гранулы. *, **, *** – уровень значимости $p < 0,05, 0,01, 0,001$ соответственно.

гранул были значительно короче (2,72 с), чем интервалы между схватываниями (4,52 с). Для всех исследованных видов наиболее продолжительным было первое удержание гранулы, продолжительность последующих удержаний закономерно снижалась. Возможно, первое тестирование может иметь особое значение в установлении вкусовых качеств пищевого объекта. Продолжительность интервалов между схватываниями варьирует гораздо слабее и остается примерно на одном уровне по мере прохождения опыта, какой либо отчетливой тенденции в изменении этого параметра не удается выявить ни у одного из исследованных видов рыб. Причины, определяющие длительность интервалов между схватываниями гранулы, не ясны. Возможно, это то время, которое необходимо для восстановления чувствительности вкусовых рецепторов к стимулам. Абсолютная и относительная длительность последовательных удержаний гранулы и интервалов между схватываниями у исследованных видов различны и, по-видимому, как и многие другие признаки, связаны с характером и стратегией питания рыб, с их образом жизни.

Продолжительность вкусового поведенческого ответа зависит и от итогового результата тестирования, то есть, была ли, в конечном счете, гранула заглочена или отвергнута рыбой: при равном числе схватываний опыты с заглатыванием гранулы всегда более продолжительны, чем опыты, заканчивающиеся отверганием, однако это различие снижается с увеличением числа повторных схватываний (табл. 1). В тех случаях, когда гранула рыбами заглатывается, средняя продолжительность каждого удержания всегда больше, чем в опытах, завершающихся отверганием гранулы, различие уменьшается с каждым последующим схватыванием. В опытах, заканчивающихся отверганием, первое удержание у исследованных рыб значительно короче, чем в опытах, в которых гранула заглатывалась: у линя – в 3,5 раза, у девятииглой колюшки – в 3,9 раза, у леща и горчака – в 10 и 20 раз соответственно (рис. 2). Таким образом, по продолжительности уже первого удержания гранулы можно с большой долей вероятности прогнозировать закончится ли опыт заглатыванием гранулы или ее окончательным отверганием.

Достоверная связь между продолжительностью удержания гранулы и последующим интервалом между отверганием и следующим схватыванием гранулы не выявлена ни для одного вида рыб ни в случаях отвергания гранулы,

Таблица 1. Средняя суммарная продолжительность вкусового поведенческого ответа девятииглой колюшки, *Pungitius pungitius*, на гранулы с аспарагиновой кислотой (0,01 М) в опытах с разным числом повторных схватываний гранулы

Число схватываний в опыте	Продолжительность вкусового ответа (в секундах) в опытах, в которых гранула была:	
	заглочена	отвергнута
1	13,4±0,8	01,2±0,1
2	15,2±0,8	04,1±0,3
3	15,0±0,9	06,6±0,4
4	17,2±0,7	08,8±0,4

ни в случаях ее заглатывания. Обнаружено также, что в опытах, заканчивающихся отверганием, период реагирования рыб на упавшую в воду гранулу, т. е. промежуток времени от подачи гранулы до ее первого схватывания рыбой, более продолжительный. Так, для леща эта величина превышала 6 сек и была почти в 2 раза выше, чем в опытах, закончивающихся заглатыванием гранулы, а для девятииглой колюшки составила почти 3 сек и превышала аналогичную величину в опытах с потреблением гранулы в 3 раза. Возможно, быстрота реагирования на гранулу связана с физиологическим состоянием подопытных особей и отражает их пищевую мотивацию, влияющую на проявление рыбами вкусового ответа. Так известно, что степень накормленности рыб может менять их восприимчивость к пищевым химическим сигналам, в частности к вкусовым. При этом у голодных рыб повышается двигательная активность и снижается пищевая избирательность, резко расширяется спектр сигналов, вызывающих проявление пищевой поисковой активности, повышается вероятность заглатывания схваченной добычи. По мере насыщения рыб пищевая селективность возрастает (Wu et al., 2003; Касумян, Сидоров, 2010). Голодные рыбы более активные, они быстрее схватывают экспериментальные гранулы или предложенные им кормовые объекты (собственные наблюдения).

Одной из интереснейших задач физиологии вкуса в настоящее время является выяснение количества времени, требуемого на проявление реакции. У девятииглой колюшки и линя длительность удержания гранулы во рту часто составляет менее 1 сек, а в отдельных опытах –

менее 0,5 сек. Это время затрачивается на реализацию целого комплекса процессов: рецепцию содержащегося в грануле вкусового вещества, передачу полученной информации во вкусовые центры и ее обработку, формирование и осуществление одного из возможных поведенческих сценариев: заглатывание гранулы, отвергание гранулы с целью последующего ее схватывания, окончательное отвергание гранулы. Согласно имеющимся литературным данным, большая часть этого времени затрачивается на обработку информации в мозговых центрах и формирование соответствующего поведенческого ответа (Halpern, 1986).

Заклучение

Таким образом, исследованные рыбы заглатывают или отвергают пищевой объект после нескольких последовательных тестирований с помощью внутриротовых рецепторов. Чем больше число таких повторных апробаций, тем длитель-

нее в целом вкусовой ответ. Это в полной мере относится к опытам, завершившимся заглатыванием гранулы и к опытам, в которых гранула в итоге рыбой отвергается. Продолжительность вкусового ответа в последнем случае значительно короче, прежде всего из-за менее длительных периодов удержания гранулы в ротовой полости. Продолжительность удержания гранулы быстро и закономерно снижается с каждым последующим схватыванием, тогда как интервалы между схватываниями изменяются менее существенно. Следовательно, время, затрачиваемое рыбами на оценку вкусовых качеств схваченного пищевого объекта, последовательно уменьшается с каждым повторным его схватыванием.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 10-04-00349) и Программы «Ведущие научные школы» НШ-3231.2010.4 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (Госконтракт № 02.740.11.0280).

Литература

Кассиль В. Г. 1972. Вкус // Физиология сенсорных систем. Ч. 2. Л.: Наука. С. 562–606.

Касумян А. О., Сидоров С. С. 2010. Влияние голодания на вкусовые предпочтения и поведение тестирования пищевых объектов у карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиологии. Е. 50. № 3. С. 388–399.

Gill A.B., Hart P.J.B. 1994. Feeding behavior and prey choice of the threespine stickleback: the interacting effects of prey size, fish size and stomach fullness // Anim. Behav. V. 47 P. 921–932.

Gill A.B., Hart P.J.B. 1996. Unequal competition between threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., encountering sequential prey // Anim. Behav. V. 51 P. 689–698.

Halpern B.P. 1986. Constraints Imposed on taste physiology by human taste reaction time data // Neuroscience & Biobehavioral Reviews V. 10 P. 135–151.

Wu L., Xie S., Cui Y., Wootton R.J. 2003. Effect of cycles of feed deprivation on growth and food consumption of immature Threespined sticklebacks and European minnows // J. Fish. Biol. V. 62. P. 184–194.

FEATURES OF TESTING BEHAVIOR AND ITS TEMPORAL CHARACTERISTICS FOR FLAVORED PELLET IN FISH WITH DIFFERENT FEEDING

E.S.Mikhailova¹, O.M.Isaeva², A.O.Kasumyan¹

¹ Moscow State University, Moscow, Russia,

elena_mikhailova@mail.ru

² Federal State Research Institution 'Institute of Ecology of Fishery Water Bodies', Krasnoyarsk, Russia,

olga-isa2@yandex.ru.

Fish make several repeated tests (grasping-retention-rejection) for the final decision about swallowing or rejection a food object (agar-agar pellets flavored with free amino acids). The response on flavored pellets was studied for ninespined stickleback *Pungitius pungitius*, european bitterling *Rhodeus sericeus amarus*, bream *Abramis brama* and tench *Tinca tinca*. It was found that number of repeated tests reaches up to 16 in bream, 11 in

stickleback, and 6 in both bitterling and tench. The more repeated tests, the longer the pellet testing. For all species, except a tench, the first retention of pellet was longest; duration of the subsequent pellet keepings naturally decreases from the first grasp to the last one. Duration of intervals between keepings was shorter than pellet retention time, had low variability and remains approximately at the same level during the experiment.

РОСТ И ПОЛОВОЕ СОЗРЕВАНИЕ САМОК АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L. БЕЗ НАГУЛА В ПРИРОДНЫХ ВОДОЁМАХ

И. Г. Мурза, О. Л. Христофоров

Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия
e-mail: bigfish@OC4414.spb.edu

Введение

Лососевые – факультативно голобиотические рыбы. Обычно они мигрируют в моря и, используя обширные кормовые ресурсы, достигают больших размеров, продуцируют крупную икру. Если миграция невозможна, весь жизненный цикл осуществляется в пресной воде. Еще полтора столетия назад В. П. Врасский выращивал атлантического (балтийского и озерного) лосося до половой зрелости на Никольском рыбноводном заводе (р/з). Позднее аналогичные работы проведены в Шотландии, Дании, Швеции, Норвегии, США и других странах. Особенно интенсивно полноцикловое выращивание стало развиваться с конца 20-го века, когда для товарного лососеводства потребовались сотни миллионов штук икры, а заход производителей в реки сократился (Jansen, McLeary, 1996). В прибрежных водах Атлантики, характеризующихся круглогодично благоприятным гидрологическим режимом, маточные стада лосося обычно содержат в крупногабаритных морских садках и береговых бассейнах, но положительные результаты получают также в пресной воде на рыбноводных станциях Финляндии и Польши (Эскелинен, 1991а; Бартель и др., 2008). Успехи названных стран способствовали возрождению интереса к созданию жилых стад и в России. Приобрели актуальность вопросы управления ростом и созреванием лосося на отечественных р/з, оценки биологической полноценности выращиваемых жилых особей в качестве замены проходным производителям при поддержании природных популяций. С этих позиций мы изучали пластичность репродуктивной функции в онтогенезе лосося (Мурза, 1979; Мурза, Оганесян, 1982; Мурза, Христофоров, 1982; Христофоров, Мурза, 1998а; и др.). Было показано, что гаметогенез в речной (заводской) и морской пе-

риоды жизни этого вида представляет собой единый процесс, не зависящий непосредственно от солёности воды. При задержке самок на рыбноводных предприятиях до достижения размеров, превышающих типичные для смолтов в период катадромной миграции, яичники у них продолжают развиваться, и наблюдается дифференциация особей на группы с разным темпом гаметогенеза. Созревающие самки пост-смолты лосося описаны нами в прудах Нарвского р/з (Христофоров, Мурза, 1985), а позднее развитие гонад у этого вида прослежено при опытно-производственном выращивании его до половой зрелости на других р/з ФГУ «Севзапрыввод»: Лужском – с 1995 г., Невском – в 1998–2001 гг. и Свирском – в 1999–2005 гг.

Цель данного сообщения – сравнить биологические, в том числе репродуктивные, показатели жилых самок первого в Ленинградской области маточного стада лосося, созданного на Лужском производственно-экспериментальном лососевом рыбноводном заводе (ЛПЭЛРЗ), с таковыми проходных самок из популяций рек Невы и Нарвы, послуживших донорами при его формировании. Кроме того, 15 лет, прошедшие с начала формирования этого стада (Мурза и др., 1997; Мурза, Христофоров, 2000, 2004а)*, – достаточный срок для оценки его вклада в поддержание лужской популяции лосося.

Предпосылки для создания маточного стада лосося на ЛПЭЛРЗ. В прошлом р. Луга играла важную роль в воспроизводстве и промысле лососевых. К началу 20-го века в ней и в Лужской губе, добывали ещё до 10 тыс. шт., а в 1930-е гг. – 3,0–3,5 тыс. шт. лосося (Гримм, 1905; Кучина,

* В 1995–1997 гг. И. Г. Мурза руководила НИР: «Формирование маточного стада и совершенствование биотехнологии воспроизводства атлантического лосося на Лужском рыбноводном заводе».

1939; и др.). Сокращение численности популяции, как отмечалось (Христофоров, Мурза, 1998б, 2000а, б; 2002, 2003), произошло вследствие лесосплава, загрязнения вод промышленными стоками и наличия плотины кожевенно-картонажной фабрики «Партизан» у Кингисеппа, многие годы преграждавшей доступ производителям к основным нерестилищам. С 1930-х до начала 1950-х гг. обсуждалась необходимость строительства рыбохода и р/з. В 1947 г. на выбранной для завода площадке у впадения р. Хревицы в р. Лугу были заложены шурфы, но проектирование началось только в 1974 г., а строительство – в 1981 г. Газета «Ленинградская правда» сообщила 12 сентября 1981 г., что крупнейший в Ленинградской области р/з «... будет выпускать до полумиллиона двухгодичной молоди лосося ежегодно. По проекту рыбобродный комплекс включает в себя цехи: инкубационный, выростной, приготовления кормов, лабораторию и другие подразделения. Всё это сложное хозяйство станут обслуживать всего 80 человек, так как большинство процессов предусматривает полную механизацию и автоматизацию». Ко времени пуска р/з в эксплуатацию 30 декабря 1989 г., производство уже морально устарело, а нативная популяция лосося р. Луги, с целью поддержания которой его строили за счёт средств компенсации ущерба от ЛАЭС, перестала существовать. Последние случаи поимки лужского лосося датированы 1964 и 1969 гг. К началу 1990-х гг. удавалось отлавливать только кумжу. Икру её привозили на ЛПЭЛРЗ также с рек Систы и Воронки. Для воспроизводства лосося сеголеток доставляли с Нарвского р/з, а икру – с рек Даугавы, Нарвы, Невы и из Финляндии. Проектную мощность р/з, предполагавшую ежегодный выпуск в р. Лугу и близлежащие реки 500 тыс. шт. двухгодовиков лосося и кумжи, снизили до 300 тыс. шт. За счёт выпусков пестряток в возрасте 1÷1+ и 0+ началось формирование новых популяций, и с 1993 г. возобновился заход лосося в р. Лугу. В 1993–1994 гг. было учтено 27 и 3 шт. В 1995–1996 гг., после организации перекрытия у дер. Струппово, поймали 46 и 34 шт. Численность и возрастной состав производителей обнаруживали чёткую связь с динамикой выпусков молоди (Христофоров, Мурза, 2003). По данным анализа структуры склеритов речной зоны чешуи в разные годы, все лососи и от 54 до 70% особей кумжи имели заводское происхождение. Доля рыб с «нерестовыми марками» на чешуе постепенно увеличилась с 4,0 до 16,0 – 38,5%. Общая численность заходивших в р. Лугу производителей лосося достигла 50–100 шт., кумжи – 200–300 шт.

Для дальнейшего увеличения репродуктивного потенциала популяций обоих видов и обеспечения ЛПЭЛРЗ икрой требовался переход к более эффективным выпускам продукции на стадии смолта*. Он не был осуществлён, так как совещание российских и финских специалистов летом 1994 г. в Санкт-Петербурге изменило направление деятельности ЛПЭЛРЗ. Решено было использовать более чем 15-летний опыт Финляндии в эксплуатации маточных стад лосося для развития этого направления в нашей стране. Приоритетным признали сохранение генофонда лосося р. Невы, но так как на Невском р/з условия для содержания стада отсутствовали, то избрали ЛПЭЛРЗ – самый новый и мощный в регионе. Завод располагал возможностью замены принудительной водоподдачи на самотёчную. На нём предусматривались также подогрев воды для инкубации икры и подрачивания личинок, система оборотного водоснабжения и охлаждения воды в цеху длительного выдерживания производителей (ДВП). Рыбоводно-биологическое обоснование (РБО) для формирования маточного стада подготовили в 1994 г. сотрудники ГосНИОРХ и АО «Форкис», взяв за основу «финскую» биотехнологию. Согласно сформулированным в РБО задачам, ЛПЭЛРЗ должен был стать центром, снабжающим икрой остальные р/з области, увеличить их мощность для обеспечения квот на вылов лосося в Балтийском море, снабдить посадочным материалом природоохранные мероприятия, связанные с восстановлением популяций в реках, и создать постоянный резерв такого материала для продажи, в том числе за рубеж. От стада численностью 1400 особей, включающего 7 генераций рыб (в возрасте от 0+ до 6+) и ежегодно пополняемого за счёт икры проходных самок, рассчитывали получать 1,4 млн. шт. икры лосося. Общий вес рыб стада должен был составить 4,176 тонн, потребность в воде – 4,09 м³/мин., в выростных площадях – 1725 м². В том числе, требовались 16 бассейнов по 100 м², отсутствовавшие на ЛПЭЛРЗ.

Формирование генераций и интенсификационные приемы. Маточное стадо предполагалось создать за счёт гамет лосося р. Невы, но фактически использовался и другой донорский материал.

* Исходя из размеров смолтов, расчисленных нами по чешуе возвращавшихся в р. Лугу производителей лосося, следовало выпускать весной молодь с длиной тела не менее 15,0 см, соответствующей стандарту, принятому в скандинавских странах.

1-я генерация стада (1993 г.) получена из икры лосося р. Луги. Для выращивания крупной молоди использовали подогрев воды. Средняя температура её при инкубации составляла 3,6 °С в январе и 2,1 °С в феврале 1994 г. Личинки вылупились в феврале – марте при 8,2 °С, тогда как в естественных температурных условиях это происходит в апреле. Кормить их начали во второй половине апреля. К началу июня рыб перевели в садки, а в конце октября вернули в основной цех на зимовку. Впервые в условиях ЛПЭЛРЗ были получены сеголетки лосося со средним весом 8,9 г, то есть в несколько раз больше нормативного (по «Инструкции ..., 1979» – 2,2–3,2 г). В конце зимовки воду подогрели до 11,0–12,0 °С, и в марте годовики стали серебриться. С учётом соотношения полов и численности карликовых самцов среди одновозрастной молоди разных размерных категорий, для стада в апреле 1995 г. отобрали 498 шт. средних по весу рыб (20,0 г).

2-я генерация (1994 г.) получена из икры лосося р. Невы. Её привезли на стадии «глазка». Личинки вылупились в апреле 1995 г. При работе с ними использовали подогрев воды. В конце мая молодь перенесли из лотков в бассейны, а с середины июля до начала ноября содержали в садках. После возвращения в цех сеголеток рассортировали. Для стада в апреле 1996 г. отобрали 1064 шт. средних по весу годовиков (21,5 г). Их перевезли в цех в Ивановском, где рыбы посеребрились.

3-я генерация (1995 г.), как и 1-я, исходно формировалась из икры лосося р. Луги. Подогрев при инкубации включили в конце января 1996 г., постепенно увеличивая температуру воды до 5,4 °С. Личинки вылупились в феврале при 6,9–7,0 °С. До середины апреля их содержали при 12 °С, а затем температуру выровняли с естественной. Из-за аварии личинки из икры лужских и невских производителей были объединены. В конце мая мальков перевели из основного цеха в бассейны цеха в Ивановском, а к середине июня – в садки. В конце октября, когда сеголеток вернули на зимовку в основной цех, их численность составила 3950 шт., средний вес – 18,0 г.

4-я генерация (1996 г.), как и 2-я, получена из икры невского лосося. О происхождении *следующих генераций* маточного стада судить затруднительно, так как ЛПЭЛРЗ со времени пуска в эксплуатацию почти ежегодно ввозил икру и, иногда, молодь с других р/з (Мурза, Христофоров, 2000б). Только за время существования маточного стада количество доставленной икры

лосося составило: с Невского р/з – 251,6 тыс. шт. (генерации 1995, 1996, 1997 гг.), с Нарвского р/з – 865,9 тыс. шт. (генерации 1996, 1997, 1998, 2000, 2001 гг.), из Финляндии («Лаукаа») – 100 тыс. шт. (генерация 1994 г.)* и сеголеток с Нарвского р/з – 204,5 тыс. шт. (генерации 1999, 2000, 2002, 2005, 2008 гг.). Производственные партии молоди, полученной из икры проходных производителей лосося разного происхождения, выпускали в р. Лугу и её притоки. С 1999 г. их дополнили выпусками потомства маточного стада. Возвращавшихся в реку проходных производителей при отлове единообразно считали «дикими лужскими». Фактически, маточное стадо сформировано на основе межпопуляционной гибридизации.

Условия содержания рыб. К началу формирования стада жилого лосося по «финской» технологии ЛПЭЛРЗ располагал только инкубационно-выростным (основным) цехом в Поречье с бассейнами 2 х 2 и 4 х 4 м. Вода подавалась из р. Хревицы насосами. Из-за сбоев в их работе, газопузырьковая болезнь нередко становилась причиной гибели молоди. На время ремонта насосов лосося переводили в садки из безузловой дели (3 х 4 х 4 и 6 х 4 х 5 м), которые устанавливали на понтонах в Ивановском водохранилище (рис. 1 а). Дважды в месяц садки промывали, так как дель обрастала нитчатками водорослями. По мере роста молоди размер ячеей увеличивали с 3 до 10 мм. Каждый раз рыб пересаживали (рис. 1 б). Для борьбы с ихтиофтириозом, триходиниозом, хилодонеллёзом, диплостомозом и миксобактериозом, наблюдавшимися у лосося в садках, проводились комплексные лечебные мероприятия. Вода в водохранилище летом прогревалась у дна до 17,0 °С, а в поверхностном слое – до 24,0 °С. В бассейнах цеха, где рыб держали в остальное время года, водообмен был ниже нормативного и варьировал от 0,14 до 0,60 л/сек. Таким образом, первые генерации маточного стада лосося, определившие его репродуктивный потенциал на период до начала 2000-х гг., формировались в относительно не-

* Икра от финского маточного стада «невской линии». Выживаемость за выдерживание и подращивание личинок была ниже нормативной. Сеголетки финского лосося лучше «приручались», но уступали потомству проходных невских производителей в устойчивости к заболеваниям и росте. При выпуске годовиками в апреле 1996 г. средний вес финского лосося составлял 14,0 г, а невского – 17,5 г. Ранее привозившаяся в 1990 г. икра от финского маточного стада имела диаметр около 4,0 мм и слабые оболочки. Большинство личинок погибло до перехода на внешнее питание, а оставшиеся особи выпущены в р. Лугу сеголетками.

благоприятных условиях. С весны 1996 г. часть рыб перевели в цех в Ивановском, где была организована самотёчная подача воды из водохранилища, а основной цех летом 1997 г. закрыли на реконструкцию. В ходе её намечали до 1998 г. переоборудовать также цех ДВП для содержания маточного стада лосося, от которого планировали ежегодно собирать 500 тыс. шт. икры. Фактически, реконструкция этого цеха и прокладка к нему водовода, обеспечивающего самотёчное поступление воды, завершились к концу 2000 г. Были установлены стеклопласти-

ковые бассейны 9 x 9, 6 x 6, 4 x 4 и 2 x 2 м (рис. 1 в, г), а также система дегазации воды. Стадо переместили в цех ДВП в 2001 г. Сезонная динамика температуры воды в выростных сооружениях этого цеха представлена на рисунке 1 д. В 2006 г. смонтирована установка замкнутого типа с терморегуляцией для инкубации икры и подращивания молоди до веса 1,0 г. Она позволила получать личинок и мальков из икры лосося маточного стада в ранние сроки, но дальнейшее их выращивание при низких естественных температурах воды вызвало затруднения.

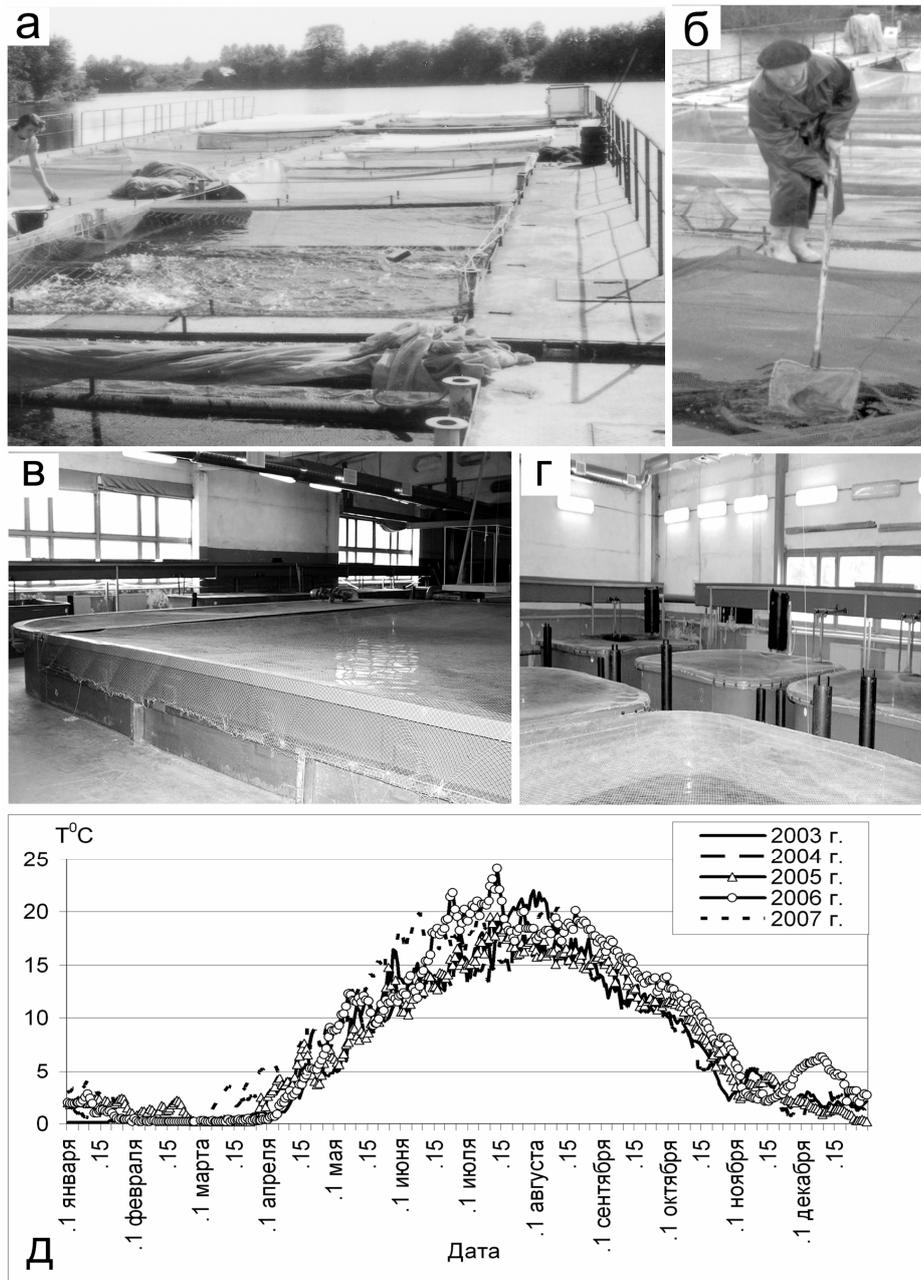


Рис. 1. а – садковая линия в Ивановском водохранилище; б – пересадка лосося; в, г – стеклопластиковые бассейны в цеху ДВП; д – сезонная динамика температуры воды в бассейнах

Корма и добавки. Использовали гранулированные корма фирм: «EWOS» (Швеция), «Rehuraíso» (Финляндия), а позднее «BioMar» (Дания). Размеры гранул и нормы кормления выбирали по таблицам. Добавляли витамины А, С, Е, раствор CaCl_2 , говяжью кровь, селезёнку, салаку, а в последние годы также биостимуляторы и адаптогены – «Пуриветин» и «Мидивет».

Методы оценки биологических показателей жилых и проходных самок. Длину тела рыб измеряли по Смитту, а затем расчисляли по чешуйным препаратам их размеры к концу каждого предшествующего года жизни по стандартной формуле: $L_f = L_t \times S_f / S_t$, где L_f – длина в конкретном возрасте, L_t – длина при поимке, S_f – расстояние вдоль большой оси чешуи от центра до края и S_t – расстояние от центра до «зимнего кольца», соответствующего конкретному возрасту (Atlantic ..., 1992). Об особенностях роста судили по изменениям длины и веса тела в онтогенезе, сезонной динамике среднесуточных приростов, а также размерно-весовым характеристикам при достижении половой зрелости. Размеры самок лосося маточного стада в конкретном возрасте сравнивали с таковыми проходных самок-производителей, отловленных для целей разведения в реках Нарве и Неве, так как популяции этих рек служили основными донорами при формировании проходной лужской популяции и стада на ЛПЭЛРЗ. Происхождение проходных самок («заводские» или «от естественного нереста») оценивали комбинированным методом, основанным на изучении внешних признаков и образцов чешуи (Antere, Ikonen, 1983). Возраст при поимке и при достижении половой зрелости определяли по чешуе и обозначали согласно правилам ИКЕС. Повторно созревающих проходных самок идентифицировали по наличию «нерестовых марок» на чешуе и исключали из выборок, принимая во внимание иные параметры роста и разрушение краевых участков чешуи. Термины «возраст», «возрастная группа» применяли, согласно Allan, Ritter, 1977, для указания общего числа прожитых рыбой лет, а также комбинации длительности пресноводного и морского периодов её жизни. Группы проходных самок, для сравнения с жилыми самками из стада, формировали по принадлежности к тем же, либо близким генерациям. Под «генерацией» понимали совокупность особей, происходящих из икры, заложенной на инкубацию в конкретный календарный год. Количество исследованных самок указано в таблицах. Сравнивали также репродуктивные показате-

тели жилых и проходных самок-производителей: темп оогенеза, возраст при наступлении половой зрелости, периодичность созревания, размеры икры и плодовитость. Для этого определяли вес рыб до и после отцеживания. Измеряли и взвешивали по 50 шт. ненабухших икринок от каждой самки, вычисляли средние значения их диаметра, веса и вариабельность. Рабочую плодовитость рассчитывали по количеству икринок в стандартной навеске 50 г и общему весу отцеженной икры без овуляторной жидкости. Анализировали окраску тела, целостность чешуйного покрова и плавников. Биологические пробы включали по 6–10 самок каждой генерации. После вскрытия этих рыб оценивали состояние внутренних органов визуально и на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином по Гейденгайну (Ромейс, 1954). Яичники взвешивали и вычисляли гонадосоматический индекс (ГСИ). Оогенез подразделяли на периоды и фазы, а развитие яичников – на стадии, согласно ранее разработанным периодизации и шкалам зрелости (Мурза, Христофоров, 1991). При обозначении фаз периода превителлогенеза использовали сокращения: ФЦР – фаза цитоплазматического роста, ФКВ – фаза формирования кортикальных вакуолей, ФЖВ – фаза формирования жировых вакуолей. Средние значения показателей, стандартные ошибки и достоверность различий между группами рассчитывали с использованием программы «Statistica 6».

Результаты и обсуждение

Линейный и весовой рост. Средняя длина тела жилых самок к концу 1-го года жизни (в 0+) на ЛПЭЛРЗ (рис. 2 а) и на Невском р/з (рис. 2 б) близка к таковой проходных самок невской и нарвской популяций, имеющих заводское происхождение (рис. 3 а-г). К концу 2-го года (в 1+) самки из маточных стад иногда даже крупнее проходных, мигрировавших из рек в возрасте 2 и 3, но уступают мигрировавшим в 1 год. В возрасте 2+ жилые самки сопоставимы по длине с проходными самками обеих популяций к концу 1-го сезона нагула в море (А.0+), независимо от возраста при миграции из рек (от 1 до 3 года), а также от общего возраста, складывающегося из длительности пресноводного и морского периодов жизни (от 1.0+ до 3.0+). Динамика линейного роста лосося маточного стада на ЛПЭЛРЗ близка к таковой рыб стада на Невском р/з (рис. 2 а, б). На обоих заводах в возрасте 5+ ÷ 6+ длина тела жилых самок составляет

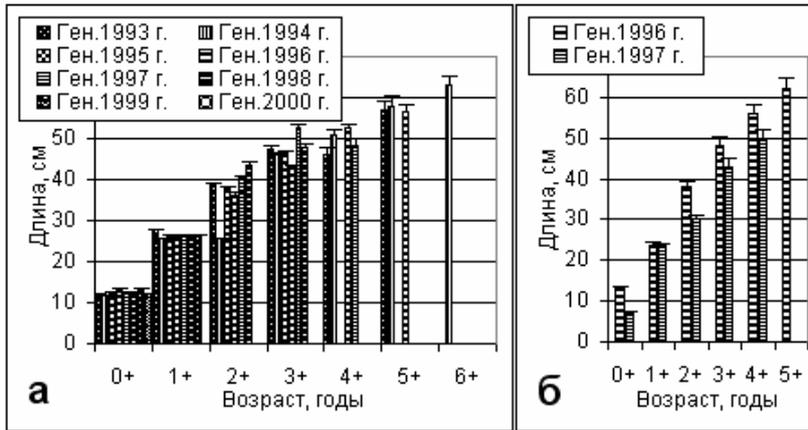


Рис. 2. Линейный рост самок лосося маточного стада: а – на ЛПЭЛРЗ; б – на Невском р/з

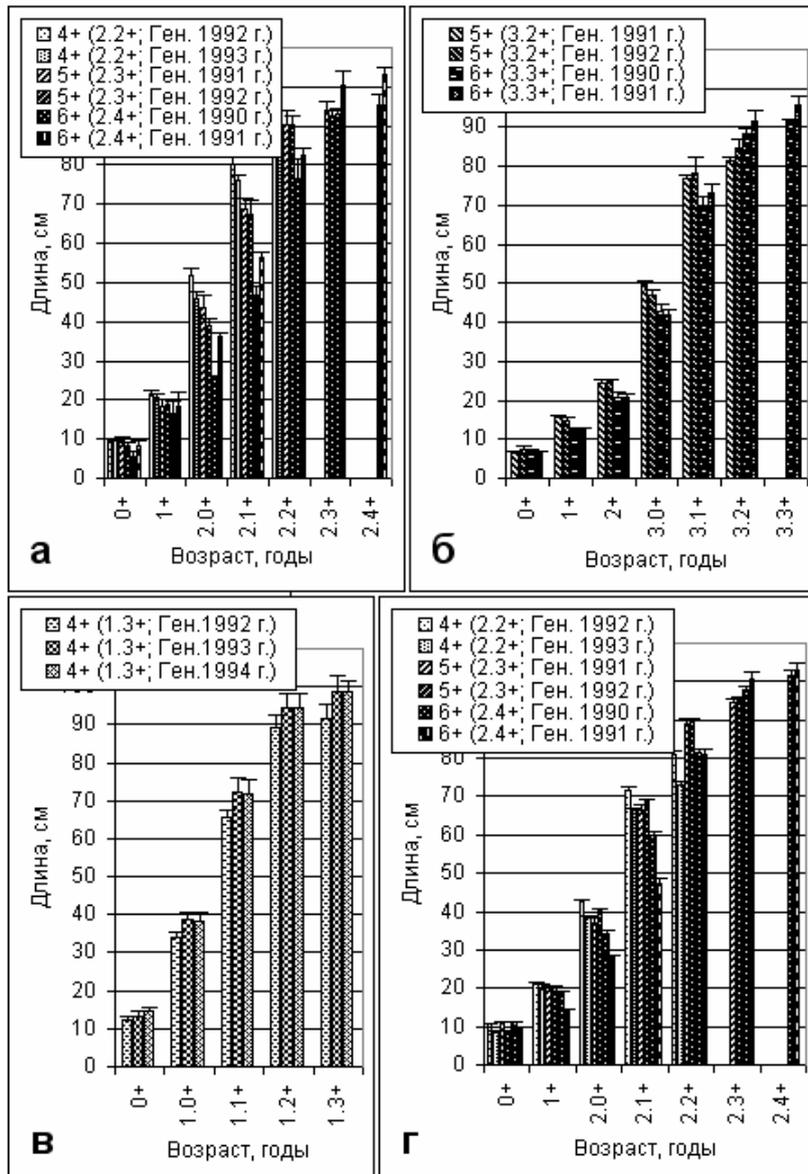


Рис. 3. Линейный рост проходных самок лосося р. Невы, ставших смолтами в разном возрасте: а – 2 года; б – 3 года. Линейный рост проходных самок лосося р. Нарвы, ставших смолтами в разном возрасте: в – 1 год; г – 2 года

около 60 см. Они соответствуют, либо уступают по размерам проходным самкам к концу 2-го сезона нагула в море (А.1+). Быстрорастущие жилые и проходные самки претерпевают смолти-

фикацию и становятся половозрелыми раньше, чем тугорослые. Замедление роста у созревающих особей сопряжено с началом вителлогенного роста ооцитов. При наступлении половой

зрелости длина тела жилых самок варьирует в диапазоне 31,9–45,0 см, а у проходных самок из рек Нарвы, Невы и Луги, с морским периодом от 2+ до 4+ она составляет обычно 65,0–107,0 см. Нетипично мелкие проходные самки лосося длиной 45,0–54,0 см, созревающие после 1 года жизни в море (2.1+ и 1.1+) появляются в этих популяциях после выпуска крупных смолтов (Христофоров, Мурза, 2005). При одинаковом общем возрасте жилые производители достоверно мельче ($P < 0,01$), чем

проходные. Есть существенные различия в линейном (рис. 2 а, б; 3 а – г), а также в весовом росте (рис. 4 а, б) между рыбами разных генераций. Динамика весового роста жилых самок генерации 1993 г. в возрасте от 2 до 4+ представлена на рис. 4, в. Среднесуточные приросты у лосося маточного стада изменяются по сезонам и с возрастом. Они больше в 1-й год жизни, чем во 2-й, а максимальные значения этого показателя у рыб обеих возрастных групп отмечены в июле (рис. 4 г, д).

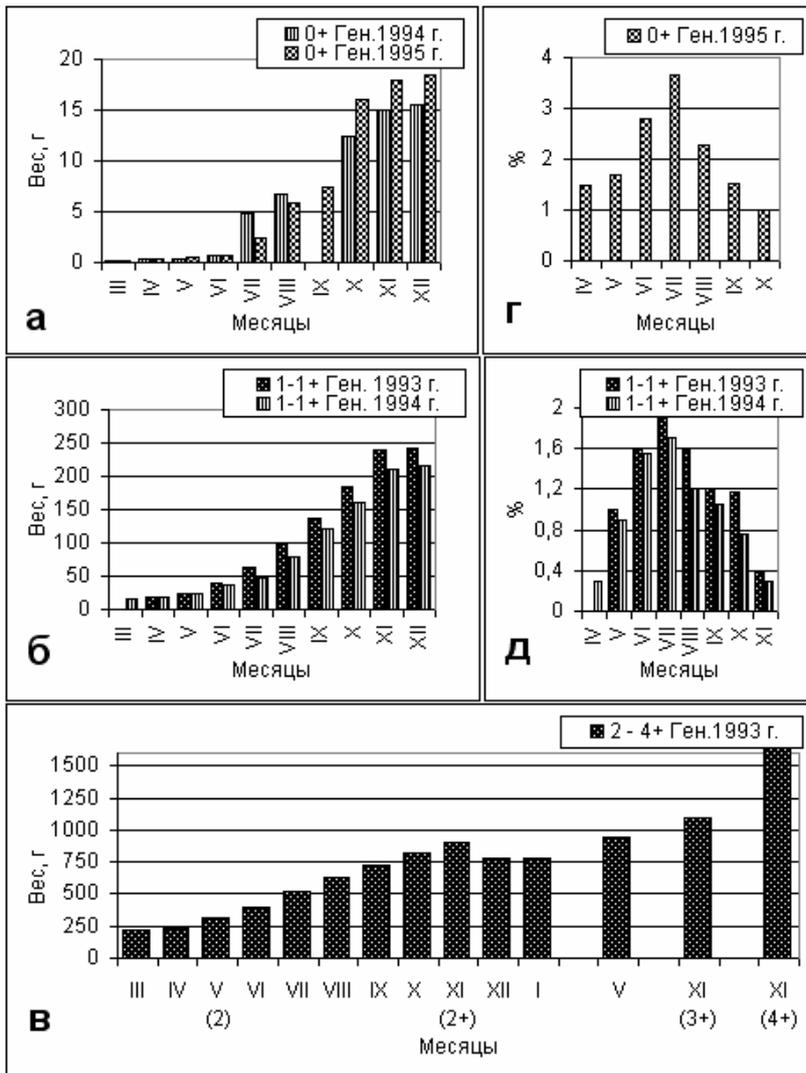


Рис. 4. Весовой рост лосося маточного стада различного возраста: а – 0+; б – 1 ÷ 1+; в – самок 2 ÷ 4+. Среднесуточные приросты лосося маточного стада различного возраста: г – 0+; д – 1 ÷ 1+

Оогенез и овуляция. Сроки анатомической, цитологической дифференцировки пола и динамика последующего развития половых желёз у лосося зависят от температурного режима в периоды инкубации икры, выдерживания и подращивания личинок, а также основного выращивания молоди. В яичниках мальков 1-й генерации маточного стада ооциты 1-й степени ФЦР появились с конца апреля – начала мая. К концу мая выявлены ооциты 2-

й степени ФЦР. Их диаметр увеличивался с 85–100 мкм в начале июня до 110–168 мкм к ноябрю – декабрю. В июне – начале июля следующего года (в 1+) ооциты достигали в развитии 3-й степени ФЦР (около 200 мкм), и их дальнейший рост в пределах этой степени продолжался до второй зимовки. С двухгодичного возраста самок можно было подразделить по состоянию яичников и значениям ГСИ (рис. 5) на две группы.

У особей 1-й группы весной и в начале лета темп развития старших ооцитов резко ускорялся. Они достигали 4-й степени ФЦР (около 360 мкм), затем ФКВ, ФЖВ периода вителлогенеза и переходили к вителлогенезу (1100–1200 мкм). Продолжительность III ранней и III поздней стадий зрелости яичников у жилых самок лосося оказалась меньше, чем у проходных из Балтийского моря, созревающих в возрасте А.2+ и А.3+ (Мурза, Христофоров, 1982; Христофоров, Мурза, 1985). Значения ГСИ быстро увеличивались в октябре – ноябре (рис. 4). Усиливался половой диморфизм, хотя с высокой вероятностью (более 80%) мы отличали самок от самцов по форме головы и размерам жирового плавника ещё в возрасте 1+. Брачный наряд жилых производителей напоминал таковой проходных, но был выражен в меньшей степени (рис. 6 а, б). Тело у созревающих самок становилось вальковатым, окраска боков и жаберных крышек – тускло-серебристой, а затем свинцово-серой. Жилые производители были небольшого размера (рис. 6 б, в). Длина тела жилых самок при созревании в возрасте 2+ варьировала от 31,9 до 45,9 см (средняя $38,8 \pm 6,97$ см), вес – от 400 до 1200 г (средний $737,7 \pm 132,45$ г.). Яичники IV стадии зрелости занимали почти всю брюшную полость, семенники – до 60–70% (рис. 6 г). Овуляция у жилых самок происходила в середине ноября, тогда как у проходных – с середины октября. Созревание части самок лосося маточного стада на 3-м году жизни соответствует ранее разработанной нами схеме, согласно которой, при определенных условиях половая зрелость наступает на следующий год после смолтификации (Мурза, Христофоров, 1991). Для оценки влияния остаточной икры на повторное созревание, часть самок отцедили и поместили. На инкубацию заложили 25 тыс. шт. икры. Диаметр ооцитов следующей генерации в ноябре – январе составлял 750–1000 мкм (ФЖВ), редко до 1400 мкм (начало вителлогенеза). К маю следующего года (в возрасте 3 года) яичники отцеженных и неотцеженных особей были на VI–III поздней стадии зрелости. Значения ГСИ варьировали от 0,61 до 1,97%. Диаметр вителлогенных ооцитов достиг 1100–1400 мкм. Остаточные икринки встречались в полости тела на протяжении лета и осени. Отцеженные и неотцеженные самки созрели повторно (в 3+) без пропуска цикла, в то время как у многих проходных самок переходу к повторному созреванию предшествует пропуск репродуктивного цикла (Мурза, Христофоров, 2000).

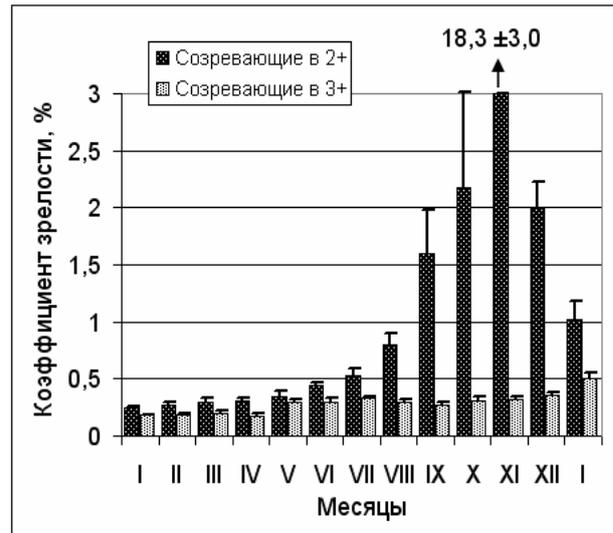


Рис. 5. Дифференциация жилых самок лосося на две группы по средним значениям ГСИ

Самки 2-й группы, не созревшие осенью в возрасте 2+, имели в то время длину от 38,0 до 46,0 см, вес – от 545 до 1110 г. Они характеризовались серебристой окраской и более высоким телом. Ооциты в яичниках были мельче, чем у особей 1-й группы: до 750–800 мкм (ФЖВ) в ноябре – декабре и 1000–1100 мкм (переход к вителлогенезу) в мае следующего года. Средние значения ГСИ увеличивались в 3-й год жизни с 0,18 до 0,51% (рис. 5), а в мае 4-го года составляли $0,53 \pm 0,021\%$. Половая зрелость у этих самок наступила в возрасте 3+. Соотношение численности самок 1-й и 2-й групп (созревших в 2+ и 3+) в генерации 1993 г. составило 1 : 1. Среди самцов той же генерации 40% были половозрелыми в 1+ и 96,5% – в 2+. В 1997 г. от впервые и повторно созревших жилых самок генерации 1993 г. получено 108,0 тыс. шт. икры. В следующих генерациях стада, подвергшихся меньшей акселерации за счёт подогрева воды, созревание самок происходило преимущественно в возрасте 3+ (до 80–90%), реже – в 4+. Они подразделялись по состоянию гонад на две группы, как и рыбы генерации 1993 г., но продолжительность идентичных фаз и периодов развития ооцитов была больше. У большинства самок к зиме, за год до наступления половой зрелости, состояние старших ооцитов соответствовало завершению ФЖВ; вителлогенез начинался весной, а не летом, и ко времени овуляции икра оказывалась крупнее, чем у самок, созревших в возрасте 2+. Икру от самок, созревавших в 2+ (2-й и 4-й генераций – 1994 и 1996 гг.), закладывали на инкубацию также в 1997 и 1999 гг. В 2000 г. в ста-

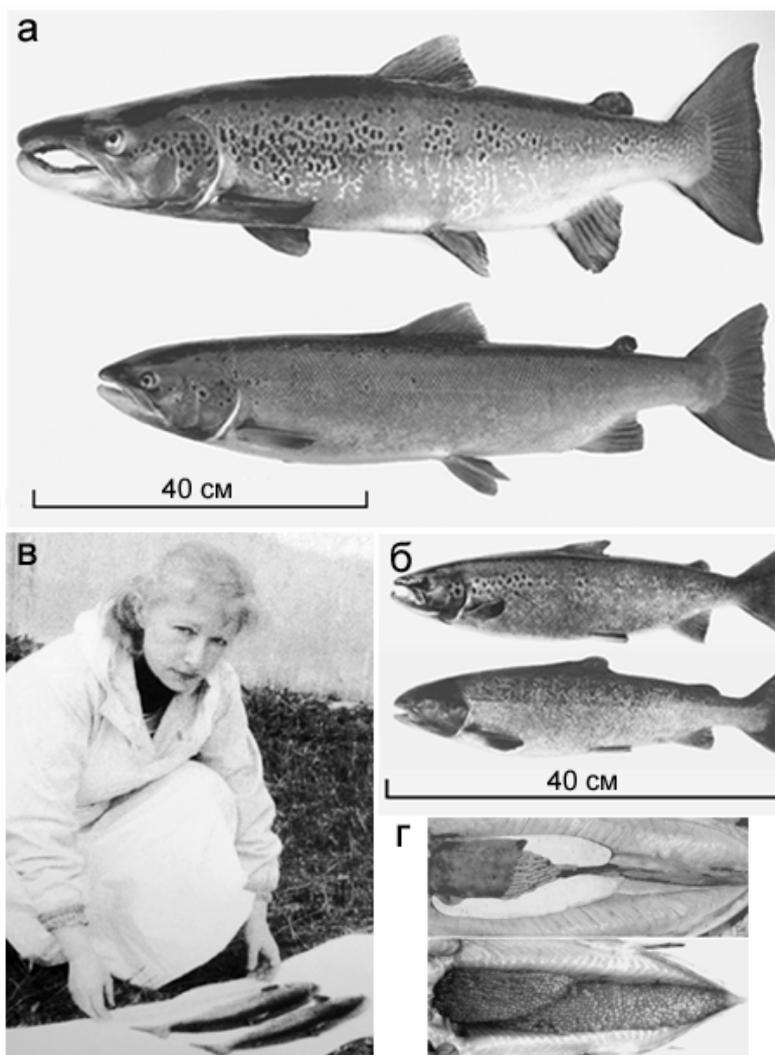


Рис. 6. а – проходные производители лосося в брачном наряде: самец и самка; б – жилые производители лосося в брачном наряде: самец и самка; в – взятие биологической пробы рыб из маточного стада на ЛПЭЛРЗ; г – семенники и яичники IV стадии зрелости жилых производителей лосося

де оставалось ещё 48 самок генерации 1994 г. (5+), а в 2001 г. – 9 шт. (6+). От 8 из них икру получили в 4-й раз. Даже без акселерации за счёт подогрева воды темп созревания у жилых особей выше, чем у проходных. Проходные самки из рек Луги, Нарвы и Невы лишь изредка становятся половозрелыми при общем возрасте 3+ (возрастная группа 2.1+), а обычно – в 4+, 5+ и 6+ (возрастные группы 2.2+, 3.2+, 2.3+, 3.3+, 2.4+). Кроме того, проходные производители голодают после захода в реки (Мурза, Христофоров, 2005), а жилые питаются перед сезоном размножения и после его завершения. За время зимовки они теряют брачный наряд и становятся похожими на вальчаков. «Нерестовые марки» на чешуе жилых самок выражены слабо. В результате перехода на круглогодичное содержание маточного стада в цехе р/з, серьёзной проблемой стало очень позднее и асинхронное созревание самок. Овуляция у них нередко происходит в конце ноября – декабре, когда качество спермы у самцов ухудшается и температура во-

ды не оптимальна. Приходится стимулировать овуляцию синтетическим аналогом гонадотропин-рилизинг гормона – сурфагоном (Михелес и др., 2002). Известно, что получаемые в результате такой стимуляции яйца лосося не всегда имеют удовлетворительное рыболовное качество (Crim et al., 1986; Taranger et al., 1992). Мы предлагали продлевать период функциональной зрелости гонад самцов лосося, используя энантат и пропионат тестостерона (Christoforov, Murza, 1996), но кардинальное решение проблемы видим в изменении условий содержания производителей обоего пола. Самки 1-й генерации стада, которых содержали в садках при естественно изменявшейся продолжительности светового дня, созревали «дружнее», чем особи следующих генераций в цехе, так как свет – один из важнейших экологических факторов, регулирующих созревание лосося (Христофоров, Мурза, 1988, 1998а). В ранних работах успешно получали икру от жилых производителей этого вида, содержавшихся в открытых прудах,

бассейнах и садках (Day, 1885; Otterström, 1933; Svärdsön, 1949; и др.). «Финская» технология станции «Лаукаа», положенная в основу РБО для ЛПЭЛРЗ, также предусматривает использование земляных прудов для содержания маточных стад. Станция располагает 72 такими прудами (Эскелинен, 1991а). Наряду с естественным освещением, в аквакультуре лосося широко используются также регулируемые световые режимы, позволяющие активно управлять сроками созревания производителей (Adams, Thorpe, 1989; Naux et al., 1991; Hansen et al., 1992; Björnsson et al., 1994; Orpedal et al., 1997, 2003; Taranger et al., 1998, 1999; Endal et al., 2000).

Плодовитость, икра и личинки. Средняя рабочая плодовитость жилых самок лосося в возрасте 2+ на ЛПЭЛРЗ составляет $2055,8 \pm 134,4$ (при индивидуальных вариациях 1000–2760) шт., в 3+ – $2573,9 \pm 107,3$ шт. и в старшем возрасте – около 3 тыс. шт. Она значительно ниже

($P < 0,01$), чем у проходных самок основных возрастных групп (табл. 1, 2).

Различия меньше в пересчёте на 1 кг веса, но около 85% жилых самок-производителей, использованных целей разведения за годы эксплуатации стада, весили меньше 2,0 кг, а проходные – в несколько раз больше. Средние значения диаметра и веса икры у жилых самок на ЛПЭЛРЗ, как и на Невском р/з, увеличиваются с возрастом (табл. 3), но остаются достоверно ниже ($P < 0,01$), чем у проходных самок невиской популяции, за исключением возрастной группы 2.1+, и у проходных самок нарвской популяции, за исключением групп 2.1+ и 2.2+ (табл. 1, 2). Как и несколько десятилетий назад (Привольнев и др., 1964), икра у невиского лосося крупнее, рабочая плодовитость меньше, чем у нарвского того же возраста. Иногда различается и цвет икры. Эти особенности могут быть обусловлены местами нагула в Балтике.

Таблица 1. Средние значения диаметра, веса ненабухшей икры и рабочей плодовитости у впервые созревающих проходных самок лосося р. Невы. Обобщённые данные по производителям генераций 1990–1997 гг.

Возраст		Диаметр икры, мм	Вес 1 икринки, мг	Рабочая плодовитость, тыс. шт.	Кол-во рыб, шт.
Общий	Речной и морской				
3+	2.1+	$4,5 \pm 0,08$	$54,5 \pm 1,79$	–	1
4+	2.2+	$5,9 \pm 0,02$	$133,2 \pm 1,22$	$6620,6 \pm 167,4$	106
5+	3.2+	$6,0 \pm 0,02$	$132,6 \pm 1,69$	$6460,9 \pm 226,4$	56
	2.3+	$6,2 \pm 0,03$	$156,8 \pm 2,16$	$9250,7 \pm 314,6$	41
6+	3.3+	$6,3 \pm 0,04$	$159,8 \pm 3,31$	$8769,1 \pm 483,7$	12
	2.4+	$6,4 \pm 0,07$	$163,2 \pm 3,15$	$12663,4 \pm 536,1$	6

Таблица 2. Средние значения диаметра, веса ненабухшей икры и рабочей плодовитости у впервые созревающих проходных самок лосося р. Нарвы. Обобщённые данные по производителям генераций 1990–1997 гг.

Возраст		Диаметр икры, мм	Вес 1 икринки, мг	Рабочая плодовитость, тыс. шт.	Кол-во рыб, шт.
Общий	Речной и морской				
3+	2.1+	$4,4 \pm 0,09$	$49,9 \pm 2,31$	8016,0	1
4+	2.2+	$5,2 \pm 0,01$	$88,3 \pm 0,81$	$11258,8 \pm 262,5$	137
5+	3.2+	$5,4 \pm 0,04$	$100,0 \pm 1,40$	$12250,4 \pm 694,5$	3
	1.3+	$5,9 \pm 0,08$	$126,5 \pm 3,65$	$17586,1 \pm 583,4$	5
	2.3+	$5,9 \pm 0,02$	$128,1 \pm 1,06$	$18181,0 \pm 517,4$	98
6+	3.3+	$5,7 \pm 0,07$	$116,3 \pm 1,79$	18056,7	1
	2.4+	$6,1 \pm 0,07$	$142,9 \pm 2,11$	18194,5	1

Таблица 3. Средние значения диаметра и веса ненабухшей икры у жилых самок из маточных стад на ЛПЭЛРЗ и Невском р/з. Обобщённые данные по поколениям 1993–1997 гг. Количество рыб в каждой возрастной группе – 20–30 шт.

Возраст	2+	3+	4+	5+
<i>ЛПЭЛРЗ</i>				
Диаметр икры, мм	$3,9 \pm 0,04^*$	$4,8 \pm 0,02$	$5,1 \pm 0,03$	$5,3 \pm 0,03$
Вес 1 икринки, мг	$35,9 \pm 2,04^*$	$69,5 \pm 1,61$	$84,3 \pm 1,58$	$93,5 \pm 2,49$
<i>Невиский р/з.</i>				
Диаметр икры, мм	–	$3,8 \pm 0,05$	$4,5 \pm 0,08$	$5,0 \pm 0,07$
Вес 1 икринки, мг	–	$34,5 \pm 1,88$	$57,2 \pm 2,34$	$78,5 \pm 1,96$

Примечание: диапазон диаметра икры – 2,9–4,4 мм, средние значения его у разных самок – 3,3–4,2 мм; диапазон веса икринки – 15–55 мг, средние значения его – 22,6–44,6 мг.

Величина коэффициента вариации веса 1 икришки у жилых самок 2+ составила 10,0–23,7 (в среднем $16,3 \pm 0,89$)%, тогда как у проходных самок – 3,6–4,3% (в среднем $4,0 \pm 0,12$)%. Отношение наибольшего значения диаметра икры к наименьшему соответствовало у жилых 1,6–3,6 (в среднем $2,1 \pm 0,11$), а у проходных – 1,09–1,34 (в среднем $1,14 \pm 0,04$). Доля нормально развивающихся эмбрионов при инкубации икры жилых самок 2+ в среднем – 76,0%, 3+ – 80,6% при нормативе 85,0%. Выживаемость икры жилых самок всех возрастных групп за инкубацию – 54,1–91,0 (в среднем 77,5)%, а икры проходных самок – 71,2–99,0 (в среднем 86,5)% при нормативе 90,0%. Длина тела личинок, вылупляющихся из икры жилых и проходных самок разного возраста, сходна, но их вес с желточным мешком существенно различается. Средние значения этих показателей у личинок из икры жилых самок 2+ составили $19,3 \pm 0,61$ мм и $41,7 \pm 0,89$ мг, 3+ – $19,7 \pm 0,34$ мм и $69,5 \pm 0,62$ мг. Длина личинок из икры проходных лужских самок – от 18,4 до 19,9 мм, вес – от 128,5 до 166,0 мг. Средняя выживаемость личинок из икры жилых самок разного возраста за подращивание – 62,1% при вариациях от 3,4 до 82,3% и нормативе 75,0%. О низком качестве икры маточного стада лосося на ЛПЭЛРЗ сообщал и И. Ю. Попов (2001). Повышенную смертность икры и личинок, получаемых от производителей маточных стад, отмечали также на других зарубежных и российских р/з (например: Jarrams, 1997; Gaston, 1988; Крамаренко и др., 2002). Отчасти она обусловлена ограниченными ресурсами желтка в мелкой икре. Личинки из крупной икры проходных самок, лучше обеспечены им и переходят к внешнему питанию позднее, при больших размерах (Привольнев, 1960). Ко времени выхода из бугров и подъема на плав личинки лосося из крупной икры характеризуются большей выносливостью, жизнеспособностью (Einum, Fleming, 2000; Moffett et al., 2006). Лучшие рыболовные показатели обеспечивает икра крупных самок, длиной 75–100 см, тогда как при использовании мелких самок выживаемость икры и личинок очень низка, в большинстве случаев гибель при переходе к внешнему питанию приближается к 100% (Петренко, Халяпина, 1979). Согласно действующей «Инструкции ..., 1979» (С. 35), икру со средним весом менее 120 мг следует отбраковывать.

Негативное влияние на стероидогенез у производителей маточных стад, качество их гамет,

процент оплодотворения икры, выживаемость эмбрионов и личинок может оказывать также неполноценность кормов по белкам, липидам, витаминам, каротиноидам, минеральным компонентам и т.д. (Torrison, 1983; Hardy, 1985; Leray et al., 1985; Eskelinen, 1989; Izquierdo et al., 2001; Fish Nutrition, 2002). Требования к составу кормов у созревающих рыб иные, чем у молоди. Им нужно больше каротиноидов, витаминов Е и С, вовлеченных в метаболизм жирных кислот и служащих антиоксидантами. При производстве коммерческих кормов природный пигмент – астаксантин, который в естественных условиях Балтийского моря лосось получает, питаясь рыбами-планктофагами, до недавнего времени часто заменяли более дешевым синтетическим кантаксантином (ныне запрещенным), либо использовали красители «Карофилл розовый» и «Карофилл красный», содержащие лишь до 8% этих соединений. Различия в биологических свойствах астаксантина и кантаксантина могут быть ответственны за более высокую смертность потомства культивируемых лососей, чем «диких» в эмбриональный и личиночный периоды (Craik, Harvey, 1986). По нашим наблюдениям, у самок маточного стада на ЛПЭЛРЗ в одни годы икра была желтоватой, в другие – оранжевой, что соответствует цветам астаксантина и кантаксантина. Исходным материалом для синтеза печени предшественника желтка икры – вителлогенина служат аминокислоты, образующиеся при расщеплении пищи, мышечных белков (при голодании), а также гликоген и липиды, мобилизуемые из жировых депо. У рыб маточного стада состояние печени иногда было значительно хуже, чем у возвращающихся из Балтики производителей, и молоди, прожившей несколько месяцев в реке. Визуально отмечались светлоспесочный цвет и рыхлая консистенция паренхимы, а на гистологических препаратах – некроз части гепатоцитов, много жировых пустот. Аналогичные изменения наблюдали Н. А. Ефимова и И. М. Долгачёва (2002). Нарушение вителлогенной функции печени может быть причиной повышенной вариабельности размеров икры.

С кормами рыбы получают жирные кислоты и аминокислоты (Остроумова, 2001), в том числе необходимые для формирования полноценной оболочки и желтка икры (Лизенко, Нефедова, 1982;). Производители лососевых кормов иногда заменяют рыбий жир более дешевыми растительными липидами, а рыбную му-

ку – соевой. Возможно поэтому, в первые годы работы с маточным стадом на ЛПЭЛРЗ мы, а в дальнейшем Ю. Н. Городилов (личное сообщение), отмечали слабые оболочки икры жилых самок. Отдельные самки имели яичники нетипично малого размера, которые на гистологических препаратах характеризовались резко выраженной асинхронностью роста ооцитов и атрезией части яйцевых фолликулов. У одной из особей с аномальными гонадами выявлена опухоль эпифиза. Не последняя роль в нарушении развития гонад у культивируемого лосося может принадлежать содержащимся в коммерческих кормах половым стероидам (Мурза, Христофоров, 2004 в). По данным Всемирной организации здравоохранения при ООН, жиры и ткани рыб, используемые для производства кормов, содержат столько токсичных соединений, что лососей, выращенных на искусственных кормах, рекомендуется есть не чаще одного раза в месяц. Возможно, некроз плавников, недоразвитие жаберных крышек, нарушение чешуйного покрова, катаракта, ухудшение состояния печени, изменения красной и белой крови, которые мы отмечали у молоди и жилых производителей лосося на ЛПЭЛРЗ (неопубл. данные), также имели трофическую природу. Развитие этих симптомов описывается при дефиците полиненасыщенных жирных кислот, витаминов и других физиологически активных веществ в кормах (Шевченко, 2005; и др.). Нами было установлено, что в крови лосося разного возраста на ЛПЭЛРЗ концентрация гемоглобина, количество эритроцитов и доля незрелых форм этих клеток (нормобластов, базофилов и полихроматофилов) закономерно увеличивались от весны к осени, а изменения лейкоцитарной формулы происходили в разные сезоны при ухудшении состояния рыб из-за болезней и стресса, вызванного нарушениями водоподачи, перевозками и т.д. Общая тенденция состояла в снижении относительной численности лимфоцитов при увеличении долей моноцитов и полиморфноядерных клеток. Аналогичные изменения клеток белой крови известны у других видов рыб после транспортировки и введения аналога кортизона (Микряков и др., 2005).

Согласно РБО, создание маточного стада должно было предотвратить распространение заболевания «М74», но вряд ли этому способствовало кормление жилых производителей фаршем из сырой балтийской салаки (Михелес и др., 2002). Именно питание проходных лосо-

сей в Балтийском море этим объектом с низкими уровнями астаксантина и тиамин (витамина В₁), но высоким содержанием тиаминазы в тканях ответственно за смертность получаемых из их икры личинок от «М74» (Мурза, Христофоров, 2004б). Финны используют для кормления маточных стад лосося не салаку, а корюшку (Эскелинен, 1991а).

Роль маточного стада в поддержании популяции лосося р. Луги. В первые годы эксплуатации стада на ЛПЭЛРЗ численность самок, использовавшихся для получения икры, увеличивалась за счёт созревания рыб очередных генераций. С 1997 г. она превысила численность проходных самок. С начала 2000-х гг., когда стадо перевели в реконструированный цех ДВП, используются не менее 150, иногда свыше 200 шт. жилых самок (рис. 7 а). Икры от них собирают значительно больше, чем от лужских проходных производителей (рис. 7 б). При этом, стали использовать меньше проходных самок и количество получаемой от них икры за время существования стада снизилось. В 2001–2002 гг. проводился только контрольный отлов лосося в р. Луге.

Первую молодь от маточного стада получили из икры, заложенной на инкубацию в 1996 г. от производителей 1-й генерации маточного стада. Средний вес сеголеток к концу сентября 1997 г. составил 11,0 г. В 1999 г. были впервые выпущены годовики, а в 2000 г. – двухгодовики, являвшиеся потомством жилых производителей той же генерации, но из икры, заложенной в 1997 г. Эти выпуски положили начало использованию стада для выполнения основной возложенной на ЛПЭЛРЗ задачи – поддержания популяции проходного лосося в р. Луге. Суммарная численность ежегодных выпусков годовиков, происходящих из икры жилых и проходных производителей, включая привозную, установилась на уровне, близком к 100 тыс. шт. (рис. 7, в). Регистрация в низовьях р. Луги некоторого количества заводских годовиков, в том числе мелких со слабым серебрением, не свидетельствует о готовности этих рыб к морской жизни. Анализ чешуи лужских проходных производителей лосося, проводившийся нами в рамках мониторинга, показал, что менее 10% молоди, выпускаемой в годовалом возрасте, мигрирует к местам морского нагула в тот же год, а остальные – в возрасте 2, реже 3 года. Это означает, что в основной массе выпускаемые годовики не являются смолтами. Учтённый возврат в р. Лугу от выпуска 5 последо-

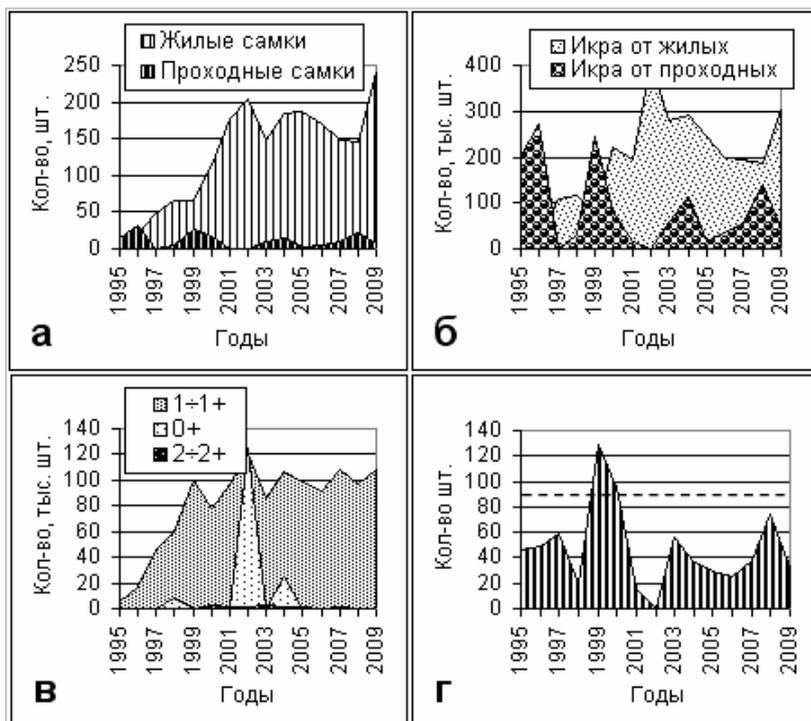


Рис. 7. Динамика воспроизводства лосося на ЛПЭЛРЗ в годы эксплуатации маточного стада: а – количество проходных и жилых самок, использованных для целей разведения; б – сбор икры от проходных и жилых самок; в – выпуск разновозрастной молоди; г – отлов проходных производителей обоего пола в р. Луге (пунктиром обозначена квота; рыб, пойманных в 1999–2000 гг. сверх квоты, выпускали выше перекрытия)

вательных генераций годовиков лосося составил 0,2–0,3%, то есть оказался близким к такому от годовалых пестряток в других реках региона (Христофоров, Мурза, 2002, 2003). Выпуски с ЛПЭЛРЗ особей в возрасте 2 ÷ 2+ за годы существования стада были незначительными и проводились преимущественно за счёт отбраковки части ремонта, в том числе карликовых самцов (0,2–3,1 тыс. шт.). Большинство двухгодовиков метили подвесными метками, снижающими, как известно, возврат в 4–5 раз. Спорадически выпускали также сеголеток (см. рис. 7, в). В результате выпусков количество отлавливаемых в р. Луге для целей разведения проходных производителей лосося после 2000 г. не увеличилось и ни разу не приблизилось к уровню квоты на отлов их в этой реке – 90 шт. (рис. 7, г). Не решены за 15 лет и другие поставленные в РБО задачи (см. Раздел: Предпосылки ...). Принимая во внимание, что основным показателем эффективности работы р/з служит состояние поддерживаемых популяций рыб, следует, по-видимому, пересмотреть биотехнологическую схему воспроизводства. Показателем положительный опыт стран, являющихся нашими соседями по Балтийскому региону. В Финляндии для восстановления почти полностью утраченных в большинстве рек популяций проходных лососевых была создана сеть государственных рыбозаводных предприятий. Главным источником рыбозаводного материала

стали маточные стада, созданные на основе импортированной в 1972–1978 гг. икры невского лосося. Становление широкомасштабного выращивания смолтов лосося происходило в 1978–1988 гг. В результате совершенствования биотехнологии средние размеры двухгодовалых смолтов увеличились до 70–100 г. За счёт более раннего на месяц вылупления личинок при повышенной температуре воды получили также 30-граммовых годовалых смолтов. К 1987 г. выпуски смолтов лосося невского происхождения возросли с 34 тыс. шт. до 1,07 млн. шт. (Эскелинен, 1991б; и др.). Польша при воссоздании полностью утраченных популяций лосося за счёт маточных стад также ориентировалась на выращивание смолтов, обеспечивающих наибольший возврат. Регулярные выпуски смолтов в реки начались с 1994 г., и численность их превысила 0,5 млн. шт. Менее чем за 10 лет промысловый вылов лосося в реках этой страны достиг 10 тонн, а сбор икры от проходных производителей – 2,5 млн. шт. (Бартель и др., 2008).

Заключение

В ходе работ, выполнявшихся на ЛПЭЛРЗ с 1995 г., показана принципиальная возможность создания в Ленинградской области маточного стада жилых производителей атлантического (балтийского) лосося и получения от

него дополнительного количества гамет для целей воспроизводства. В 1996 г. впервые заложена на инкубацию икра от жилых самок. Установлено, что темп гаметогенеза у них выше, чем у проходных особей в море, половая зрелость наступает в более раннем возрасте и при меньших размерах, а повторное созревание происходит ежегодно. Для того чтобы не усиливать скороспелость рыб, предназначенных для формирования стада, предлагается свести до минимума использование подогрева воды. Рабочая плодовитость жилых самок в несколько раз ниже, чем проходных из рек Невы и Нарвы. Они уступают проходным самкам лосося также по размерам икры и её рыбопродуктивности. Отчасти качество икры, как полагаем, можно улучшить за счёт подбора кормов. Синхронизировать овуляцию у жилых самок позволило бы содержание производителей маточного стада в летне-осенний период не в цеху, а под открытым небом – при естественной динамике освещённости и продолжительности светового дня. В целом, оценивая плюсы и минусы маточного стада лосося на

ЛПЭЛРЗ, мы, как и прежде (Христофоров, Мурза, 2002) считаем нецелесообразным с биологической и экономической точек зрения долговременное содержание на региональных лососевых р/з 5–6 генераций тугорослых особей общим весом несколько тонн, требующее значительных выростных площадей, много дорогостоящих кормов и т.д. Предпочтительней использовать эти ресурсы для выращивания производственной молоди, предназначенной для выпуска в реки. Основной продукцией р/з должны быть смолты, возврат от которых на порядок выше, чем от молоди на ранних этапах развития. Для сбора икры необходимо полнее использовать доступный контингент проходных производителей лосося.

Благодарим сотрудников Отдела воспроизводства водных биоресурсов ФГУ «Севзапрывод» и коллектив ЛПЭЛРЗ за эффективное сотрудничество в период выполнения исследований. С большой признательностью за конструктивную поддержку вспоминаем ныне покойного директора завода Ю. И. Кузьмина.

Литература

Бартель Р., Гущин А. В., Стратанович Д. Б. 2008. Лососевые рыбы южной части Балтийского моря // Рыбное хоз-во. № 4. С. 43–46.

Гримм О. А. 1905. Судьба лужских лососиков // Вестн. рыбной промышленности. № 4. С. 211–212.

Ефимова Н. А., Долгачева И. М. 2001. Проблемы содержания маточных стад различных промысловых рыб // Мат. науч.-практ. конф.: «Проблемы и перспективы развития аквакультуры в России». Адлер. С. 11–15.

Инструкция по разведению атлантического лосося (составители: Яндовская Н. И., Казаков Р. В., Лейзерович Х. А.) 1979. Л. ГосНИОРХ. 96 с.

Лизенко Е. И., Нефедова З. А. 1982. Характеристика жирнокислотного состава некоторых морфологических структур в процессе эмбрионального развития лосося // Тез. докл. V Всес. конф.: «Экологическая физиология и биохимия рыб». Севастополь. Киев.: «Наукова Думка». Часть 3. С. 84–85.

Крамаренко И. Я., Лапочкина Н. И., Артамонова В. С., Махров А. А. 2002. Опыт создания пресноводного маточного стада семги (*Salmo salar* L.) // Тез. докл. конф.: «Проблемы воспроизводства, кормления и борьбы с болезнями рыб при выращивании в искусственных условиях». Петрозаводск. С. 68–72.

Кучина Е. С. 1939. Материалы по промыслу и биологии лосося р. Луги // Изв. ВНИОРХ. Т. 21. С. 157–173.

Микряков В. Р., Терещенко В. Г., Микряков Д. В. 2005. Использование индекса Шеннона для оценки последствий влияния стресс-факторов на структурную организацию состава лейкоцитов рыб // Вопр. рыболовства. Т. 6. № 3(23). С. 518–532.

Михелес Т. П., Ермакова Н. А., Петренко Л. А., Шумилина А. К., Эрнандэс С. А., Федоров В. С., Франк О. Е., Дмитриева Т. Д. 2002. Экономические и биотехнические аспекты искусственного воспроизводства ценных видов рыб в Российской Федерации // Рыбное хоз-во. Серия: Воспроизводство и пастбищное выращивание гидробионтов / Обзорная информация. Вып. 1. М.: ВНИЭРХ. 67 с.

Мурза И. Г. 1979. Особенности гаметогенеза у атлантического лосося *Salmo salar* L. и кумжи *Salmo trutta trutta* L. и *Salmo trutta caspius* Kessler в связи с прогнозированием сроков наступления половой зрелости // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. Вып. 163. С. 56–69.

Мурза И. Г., Оганесян С. А. 1982. Состояние гонад у атлантического лосося *Salmo salar* L. в морской период жизни // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. Вып. 178. С. 39–47.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 1982. Оогенез у атлантического лосося *Salmo salar* L. // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. Вып. 178. С. 48–75.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 1991. Определение степени зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атланти-

ческого лосося и кумжи: Методические указания. Л.: ГосНИОРХ. 121 с.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 2000. Пластичность смолтификации и созревания у атлантического лосося // Тез. докл. Международной конф.: «Атлантический лосось (биология, охрана и воспроизводство)». Петрозаводск. С. 38.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 2004а. Рост, смолтификация и раннее половое созревание атлантического лосося (*Salmo salar* L.) в условиях современных рыбоводных заводов Северо-Запада России // Тез. докл. Международной науч. конф.: «Проблемы естественного и искусственного воспроизводства рыб в морских и пресноводных водоемах». Ростов-на-Дону. С. 103–106.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 2004б. Факторы, влияющие на эффективность поддержания Россией национальных ресурсов атлантического лосося в бассейне Балтийского моря // Мат. VII Международной конф.: «Акваторра – 2004», СПб. С. 233–236.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 2004в. Содержание тестостерона в кормах для лососевых рыб // Мат. Международной конф.: «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск. С. 96.

Мурза И. Г., Христофоров О. Л. 2005. Вальчаки атлантического лосося, *Salmo salar* L., в период катадромной миграции из рек Балтийского и Белого морей // Мат. IV(XXVII) Международной конф.: «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». Вологда. Часть 2. С. 32–35.

Мурза И. Г., Петренко Л. А., Котова Е. В., Маленко А. Г., Христофоров О. Л., Елисеев В. В. 1997. Формирование маточного стада атлантического лосося на Лужском рыбоводном заводе // Тез. докл. 1-го Конгресса ихтиологов России. Астрахань. М. ВНИРО. С. 319.

Остроумова И. Н. 2001. Биологические основы кормления рыб. СПб, ГосНИОРХ. 372 с.

Петренко Л. А., Халяпина Л. М. 1979. Влияние некоторых рыбоводных показателей у самок на выживаемость икры и молоди атлантического лосося // Тез. докл. IV Всес. конф.: «Экологическая физиология и биохимия рыб». Астрахань. С. 153–154.

Попов И. Ю. 2001. Лососевые рыбы реки Луги (Ленинградская область // Тез. докл. Международной конф.: «Биоразнообразии Европейского Севера (теоретические основы изучения, социально-правовые аспекты использования и охраны)». Петрозаводск. С. 140–141.

Привольнев Т. И. 1960. Влияние величины икринок на рост молоди лосося (*Salmo salar* L.) // Тр. Томского ун-та. Т. 148. Сер. биол. С. 93–102.

Привольнев Т. И., Галкина З. И., Галкин Г. Г. 1964. Неоднородность зрелой икры лосося (*Salmo salar* L.) и леща (*Abramis brama* L.) // Изв. ГосНИОРХ. Т. 58 С. 150–158.

Ромейс Б. 1954. Микроскопическая техника. М.: «Иностранная литература». 718 с.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 1985. Некоторые аспекты изучения развития и функции гонад у атлантического лосося *Salmo salar* L. // Сб. науч. тр. ГосНИОРХ. Вып. 238. С. 82–123.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 1988. Репродуктивная функция у лососевых рыб при интенсивных формах аквакультуры. Обзорная информация. Серия: Марикультура. Вып. 1. М.: ЦНИИТЭИРХ. 48 с.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 1998а. Репродуктивная функция и её контроль у атлантического лосося. В кн.: Атлантический лосось. Ред. Р. В. Казаков. СПб.: «Наука». С. 75–126.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 1998б. Состояние популяций лососевых рыб на Северо-Западе России // Рыбное хоз-во. № 4. С. 43–44.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 2000а. Структура популяций и эффективность заводского воспроизводства атлантического лосося на Северо-Западе России // Тез. докл. Международной конф.: «Атлантический лосось (биология, охрана и воспроизводство)». Петрозаводск. С. 60–61.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 2000б. Современное состояние популяций атлантического лосося и кумжи на Северо-Западе России и эффективность рыбоводных мероприятий, направленных на их сохранение (данные мониторинга) // Мат. совещ.: «Воспроизводство рыбных запасов». Ростов-на-Дону. 1998. Москва. С. 126–133.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 2002. Промысел и воспроизводство атлантического лосося в бассейне Балтийского моря: общая характеристика и вклад России // Вопр. рыболовства. Т. 3. № 2 (10). С. 227–247.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 2003. Состояние популяций и воспроизводство атлантического лосося в российском секторе Балтийского моря // Атлантический лосось: биология, охрана и воспроизводство / NASCO. Ин-т биол. Карел. науч. центра РАН. Петрозаводск. С. 165–174.

Христофоров О. Л., Мурза И. Г. 2005. Рост и смолтификация у атлантического лосося *Salmo salar* L. при современных условиях выращивания на Невском рыбоводном заводе // Мат. Международной конф.: «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». Петрозаводск. С. 187–196.

Шевченко Д. Г. 2005. Эффективность продуктов глубокой переработки крабов в составе комбикормов для молоди радужной форели Автореф. дисс. ... к.б.н. М.: ВНИИПРХ. 25 с.

Эскелинен У. 1991а. О деятельности рыбоводной исследовательской станции Лаукаа (Финляндия) // Сб. науч. трудов ГосНИОРХ. Вып. 297. С. 44–51.

Эскелинен У. 1991б. Разведение атлантического лосося *Salmo salar* L. невского происхождения в

Финляндии и его история // Сб. науч. трудов ГосНИОРХ. Вып. 297. С. 6–10.

Adams C.E., Thorpe J.E. 1989. Photoperiod and temperature effects on early development and reproductive investment in Atlantic salmon *Salmo salar* L. // Aquaculture. Vol. 79. Iss. 1–4. P. 403–409.

Allan I.R.H., Ritter J.A. 1977. Salmonid terminology // J. Intern. Cons. Explor. Mer. N37. P. 293–299.

Antere I., Ikonen E. 1983. A method of distinguishing wild salmon from those originating from fish farms on the basis of scale structure // ICES C.M.: 26.

Atlantic salmon scale reading guidelines // ICES Coop. Res. Rep. 1992. Ed. W.M. Shearer. Denmark, Copenhagen. Vol. 188: 45 p.

Björnsson B.Th., Taranger G.L., Hansen T., Stefansson S.O., Haux C. 1994. The interrelation between photoperiod, growth hormone and sexual maturation of adult Atlantic salmon // Gen. Comp. Endocrinol. Vol. 93. N1. P. 70–89.

Craik J. C. A., Harvey S. M. 1986. The carotenoids of eggs of wild and farmed Atlantic salmon, and their changes during development to the start of feeding // J. Fish Biol. Vol. 29. N5. P. 549–565.

Christoforov O.L., Murza I.G. 1996. Effects of the androgen preparation «Testoenatum» on reproductive function in males of Atlantic salmon and several species of whitefish // Aquat. Living Resour. N9. Iss. 1. P. 31–41.

Crime L.W., Glebe B.D., Scott A.P. 1986. The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning in female Atlantic salmon, *Salmo salar* // Aquaculture. Vol. 56. Iss. 2. P. 139–149.

Day F. 1885. On the breeding of salmon from parents which have never descended to the sea. Trans. Linn. Soc. Lond. 2. P. 447–468.

Einum S., Fleming I.A. 2000. Selection against late emergence and small offspring in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Evolution. Vol. 54. N2. P. 628–639.

Endal H.P., Taranger G.L., Stefansson S.O., Hansen T. 2000. Effects of continuous additional light on growth and sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared in sea cages // Aquaculture. Vol. 191. Iss. 4. P. 337–349.

Eskelinen P. 1989. Effects of different diets on egg production and egg quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Aquaculture. Vol. 79. N1–4. P. 275 — 281.

Gaston P.B. 1988. Atlantic salmon culture for restoration. U.S. Fish and Wildlife Service Northeast Region Newton Corner, MA. 141 p.

Fish Nutrition. 2002. / Eds. J. E. Halver, R. W. Hardy. Elsevier Inc. 824 p.

Hansen T., Stefansson S.O., Taranger G.L. 1992. Growth and sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in sea cages at two different light regimes // Aquaculture Res. Vol. 23. Iss. 3. P. 275–280.

Hardy R. W. 1985. Salmonid broodstock nutrition // Proc. Intern. Symp. Salmonid Reproduction. / Eds. R. N. Iwamoto, S. Sower. P. 98–108.

Haux C., Hansen T., Stefansson S.O., Taranger G.L., Walther B.T., Björnsson B.Th. 1991. Effects of photoperiod on plasma GtH I and GtH II levels during sexual maturation in Atlantic salmon // Proc. 4th Intern. Symp. Reprod. Physiol. Fish / Eds. Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E., Rolfe M.S. Norwich, UK. P. 26.

Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H., Tacon A.G.J. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish // Aquaculture. Vol. 197. Iss. 1–4. P. 25–42.

Jansen M., McLeary R. 1996. Characteristics of current international trade of live salmonid eggs // Rev. Sci. Tech. Vol. 15. N2. P. 423–433.

Jarrams P. 1997. Egg, fry and smolt production from salmon, *Salmo salar* L. and sea trout *Salmo trutta* L. reared entirely in fresh water // J. Fish. Biol. Vol. 15. N5. P. 607–611.

Leray C., Nonnotte G., Roubaud P., Leger C. 1985. Incidence of (ω -3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes // Reprod. Nutr. Dev. Vol. 25. N3. P. 567–581.

Moffett I.J.J., Allen M., Flanagan C., Crozier W.W., Kennedy G.J.A. 2006. Fecundity, egg size and early hatchery survival for wild Atlantic salmon, from the River Bush // Fish. Manag. Ecol. Vol. 13. Iss. 2. P. 73–79.

Oppedal F., Taranger G.L., Juell J.-E., Fosseidengen J.E., and Hansen T. 1997. Light intensity affects growth and sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts in sea cages // Aquat. Living Resour. Vol. 10. Iss. 6. P. 351–357.

Oppedal F., Taranger G.L., Hansen T. 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod // Aquaculture. Vol. 215. Iss. 1–4. P. 145–162.

Otterström C.V. 1933. Reife Lachse (*Salmo salar*) in Teichen // Journal du Council. Vol. 8. N1. P. 83–89.

Svärdson G. 1949. Salmon (*Salmo salar* L.) with no adipose fin // Rep. Inst. Freshwat. Res. Drottningholm. N29. P. 112–114.

Taranger G.L., Stefansson S.O., Hansen T. 1992. Advancement and synchronization of ovulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following injections of LHRH analogue // Aquaculture. Vol. 102. Iss. 1–2. P. 169–175.

Taranger G.L., Haux C., Stefansson S.O., Björnsson B.Th., Walther B.Th., Hansen T. 1998. Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and estradiol-17 β profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar* // Aquaculture. Vol. 162. Iss. 1–2. P. 85–98.

Torrissen O. 1983. Pigmentation of salmonids: Effects of carotenoids in eggs and start feeding diet on survival and growth rate // Abstr. Intern. Symp. Salmonid Reprod. Seattle, Washington. P. 21.

GROWTH AND SEXUAL MATURATION OF ATLANTIC SALMON FEMALES IN CAPTIVE BROOD STOCK

I.G. Murza, O.L. Christoforov

*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia,
e-mail: bigfish@OC4414.spb.edu*

The study aimed to evaluate possibility for use of resident (captive reared) salmon females as a substitute of diadromous females at the Luga hatchery breeding procedure. It was revealed that resident females are significantly smaller, except comparison between the most senior age-groups of resident and the most junior age-groups of migratory fish. The resident females become mature at earlier ages, possess an annual re-

maturation, lower fecundity per fish and produce eggs of smaller size as compared with the same in sea-run salmon spawners. Duration of some comparable stages of ovaries development is shorter, season of ovulation is later, and percentages of eggs fertilization as well as survival of alevins are decreased often in resident females. Usage of sea-run females is preferable for hatchery propagation of salmon.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ *CALANUS* – ОСНОВНЫХ ОБЪЕКТОВ ПИТАНИЯ ДЛЯ АРКТИЧЕСКИХ ВИДОВ РЫБ (ОБЗОР)

С. А. Мурзина, Н. Н. Немова, З. А. Нефедова

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: imagination@onego.ru

Пищевые цепи в пелагических морских экосистемах берут начало от фитопланктона (первичных продуцентов) и далее передача и трансформация вещества и энергии осуществляется путем поглощения фитопланктона растительноядными организмами – зоопланктоном – рыбами – до млекопитающих более высоких трофических уровней (Falk-Petersen et al., 1990). Копеподы – основное звено между рыбами и фитопланктоном – считаются первыми жертвами личинок рыб в естественных условиях (Falk-Petersen et al., 2006). Зоопланктон полярных регионов запасает энергию, главным образом в форме липидов, основным компонентом которых являются восковые эфиры, они могут быть использованы в течение длительного периода развития, обеспечивая энергией все процессы жизнедеятельности организма.

Calanus hyperboreus, *Calanus glacialis*, *Calanus finmarchicus* – доминирующие растительноядные копеподы в арктических водах (Arnkvaen et al., 2005). *Calanus glacialis* обитает в шельфовых водах Арктических морей (Hirche et al., 1997; Scott et al., 2002). *Calanus finmarchicus* – преимущественно обитает в северо-атлантических водах и течением перемещается в Арктические моря (Hulsemann et al., 1990; Hirche, 1991). Таким образом, все эти виды можно встретить в сходных мес-

тах обитания, что и было показано в большинстве исследований, проведенных в Арктике.

Фитопланктон является важнейшим пищевым источником для этих трех видов каланусов, которые конвертируют углерод растений в высокоэнергетические восковые эфиры (Falk-Petersen et al., 2002; Arnkvaen et al., 2005), составляющие основной компонент липидов этих организмов (Sargent et al., 1976; Scott et al., 2002). Размерные характеристики каланусов коррелируют с уровнем липидов в их теле: наибольший по размерам *C. hyperboreus* и средний – *C. glacialis* содержат много липидов на единицу тела, в то время как небольшой по размерам *C. finmarchicus* обнаруживает их меньшее содержание (Scott et al., 2000, 2002). Уникальность и важность каланусов заключается в том, что они за короткий летний период накапливают энергетически богатый компонент – липиды, который по цепям питания передается более высокоорганизованным организмам (Arnkvaen et al., 2005; Ashjian et al., 2003; Falk-Petersen et al., 1990; Falk-Petersen et al., 2002; Hagen et al., 2001; Scott et al., 2002).

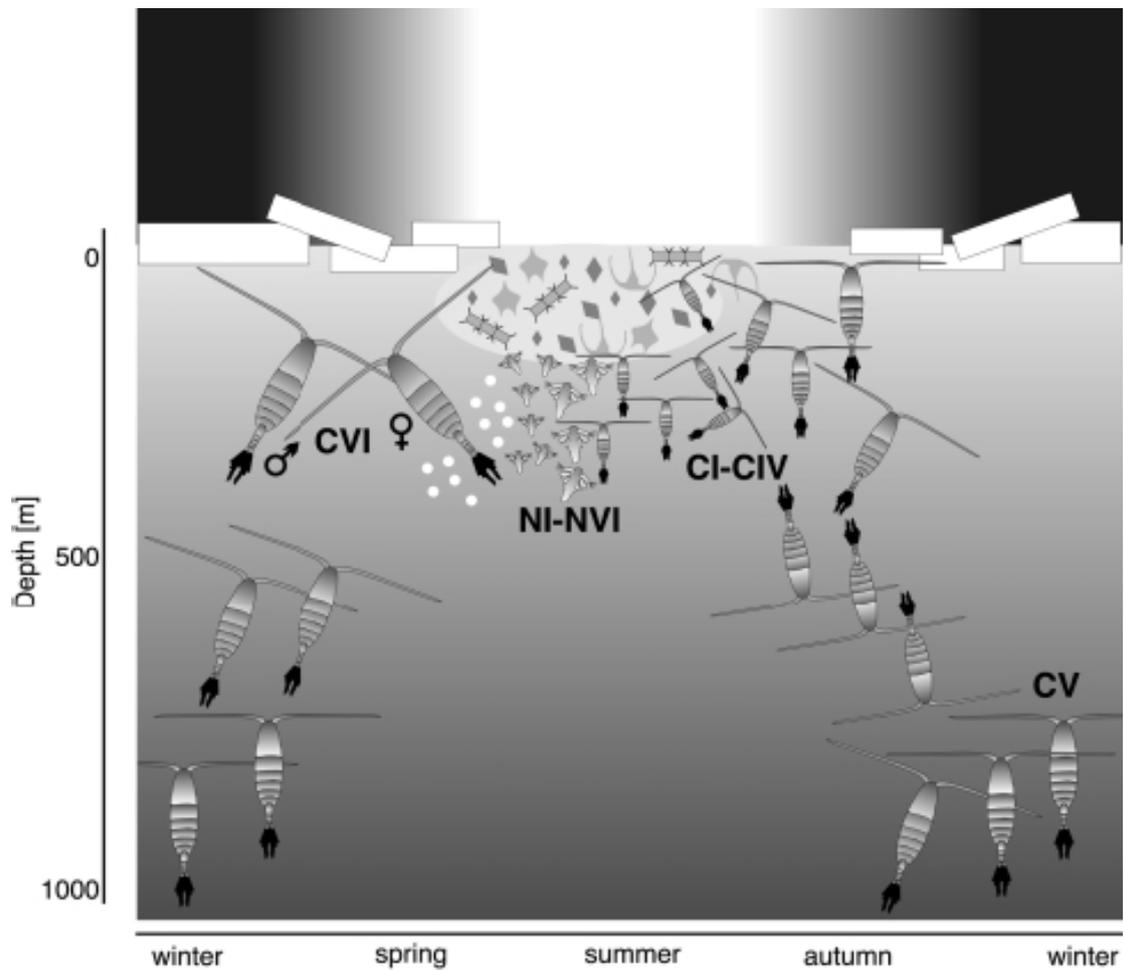
Прежде всего, нужно обратить внимание на особенности жизненного цикла и те адаптивные стратегии, которые выработались у этих копепод в условиях обитания Арктики (табл.).

Особенности биологии арктических видов *Calanus*: жизненный цикл (ЖЦ/год); преобладающие стадии (ПС): IV – копеподитная стадия 4, V – копеподитная стадия 5, F – самки; макс. размер – максимальный размер (мм); вес липида (мг х инд⁻¹); ОЛ – общий липид (% от сухого вещества); В – воска (% от общих липидов) (Falk-Petersen, Pavlov, Timofeev, 2006)

Виды	ЖЦ	ПС	Макс. размер	Вес липид	% ОЛ	% В
<i>C. finmarchicus</i>	1	IV	2,2	0,02	53	63
		V	3,0	0,04	34	68
		F	3,2	0,08	31	62
<i>C. glacialis</i>	2–3	IV	2,8	0,05	56	68
		V	4,0	0,38	61	72
		F	4,6	0,45	70	68
<i>C. hyperboreus</i>	2–5	IV	4,0	0,28	54	72
		V	6,0	1,03	65	75
		F	7,0	1,81	62	75

Calanus finmarchicus – наименьший по размерам (Hirche et al., 2001; Scott et al., 2000, 2002) из трех представленных видов каланусов, это преимущественно атлантико-бореальный глубоководный вид (Scott et al., 2002). Он имеет два основных центра распространения, один из них связан с водами Норвежского моря, второй – с субарктической зоной, южнее Лабрадора и восточнее Ньюфаундленда (Falk-Petersen et al., 2006). В дополнение к этому, известно, что южнее Ньюфаундленда существует небольшая суб-популяция данного вида (Aksness et al., 1997). Так как вид *C. finmarchicus* с 1-годовалым жизненным циклом, то и территории, где

он встречается, а главное развивается, характеризуются цветением фитопланктона в этот период (Hagen et al., 2001). В опытах проведенных научной группой под руководством Хирше (Hirche, 1997) было показано, что плодовитость и начало икротетания тесно связаны с изменениями и доступностью фитопланктона для самок. Развитие *C. finmarchicus* начинается с момента откладки яиц и проходит через 6 науплиальных и нескольких копеподитных стадий (Hirche et al., 2001), до их главной 5 стадии (CV), в которой они перезимовывают (от 6 до 10 недель в благоприятные годы) (Falk-Petersen et al., 2006) (рис.).



Онтогенетическое развитие и сезонная вертикальная миграция полярных видов копепод с 1-годовалым циклом развития: NI-NV – науплиальные стадии 1–5, CI-CV – копеподитные стадии 1–5 (Hagen, Auel, 2001)

Основное запасное вещество у этого вида – липиды, которые составляют от 33,7 до 53,0% сухой массы на стадиях CV-CIV и около 31,1% сухой массы у взрослых самок (Scott et al., 2000). Основную массу липидов у самок составляют восковые эфиры – около 62,3% от

общих липидов, на полярные липиды приходится 15,9% общих липидов, на триацилглицерин стеролы – 6,2 и 3,7% общих липидов, соответственно (Scott et al., 2000). Благодаря большой массе запасных липидов *C. finmarchicus* могут зимовать на глубинах от

500 м до 2000 м (Gislanson et al., 1998). Половая зрелость и подготовка к икрометанию у них наступает непосредственно перед цветением фитопланктона (Hagen et al., 2001). В период цветения, когда пища наиболее доступна, увеличивается процесс икрометания и количество яиц, производимых одной самкой. Таким образом, плодовитость *C. finmarchicus* тесно связано с качеством и количеством пищи потребляемой ими в период половой зрелости.

Calanus glacialis – типичный шельфовый вид, который откладывает икру в шельфовых водах морей Арктики и в Белом море (Falk-Petersen et al., 2006; Hirche et al., 2001; Scott et al., 2000, 2002). Шельфовая зона, как известно, характеризуется очень сильным колебанием условий обитания, а в Арктике большая часть этой зоны покрыта льдом. В период, когда сходит лед (лето-осень), в этой зоне происходит цветение фитопланктона, который является основной пищей для зоопланктона (Niehoff et al., 2002). Однако, в зависимости от региона исследования, этот вид рачков можно встретить и в более ранние сроки: конец февраля – начало марта (Arnkvaen et al., 2005). Жизненный цикл *C. glacialis* длится от 1 года до 3 лет (Falk-Petersen et al., 2006), хотя некоторые исследователи отмечают 2-годовой цикл (Arnkvaen et al., 2005). Икрометание начинается в начале марта и молодые копеподитные стадии можно обнаружить в начале мая. Рост и развитие происходят медленно. В течение этого периода, на разных стадиях развития *C. glacialis*, возможны перемещения в пределах ареала и накопление запасных липидов (Arnkvaen et al., 2005). *C. glacialis* зимует на копеподитных стадиях 4–5 (CIV, CV) при этом они опускаются на шельфовые глубины (200–300 м) и впадают в диапаузу (Scott et al., 2000). Запасы липидов на копеподитных стадиях 4–5 у *C. glacialis* выше, чем у *C. finmarchicus*, и составляет 56,2 и 60,6% сухой массы, но у самок это показатель может достигать 70,0% (Scott et al., 2000). Количество восковых эфиров на этих стадиях у *C. glacialis* составляет 67,5 и 71,5% общих липидов, полярных липидов – 15,9 и 13,7%, триацилглицеринов – 2,1 и 5,8%, стеролов – 3,1 и 2,0% общих липидов (Scott et al., 2000, 2002). У *C. glacialis* более длинный по сравнению *C. finmarchicus* жизненный цикл, в течение которого идет последовательное накопление липидов на всех стадиях развития, в том числе и во время диапаузы (на стадиях CIV- CV) (Arnkvaen et al., 2005).

Calanus hyperboreus – самый полярный и глубоководный вид, который встречается в водах морей, принадлежащих к бассейну Северного Ледовитого океана (Scott et al., 2002). Условия обитания для этих каланусов очень суровые – происходят суточные, сезонные и годовые колебания. В более благоприятный сезон, когда сходит лед и наблюдается изобилие пищи, происходит развитие каланусов. Из трех видов каланусов наиболее приспособлен к условиям обитания в Арктике *C. hyperboreus*, развитие его очень пластично, а жизненный цикл имеет свои особенности. В более благоприятные годы, этот вид калануса имеет 2-годовой жизненный цикл (Атлантика), а в менее благоприятное время – от 3 до 5 лет (Северный Ледовитый океан, моря Гренландии, Канады) (Hirche, 1997; Madsen et al., 2001; Pavshikov, 1983). Такая динамика развития связана с уровнем обеспечения пищей на разных стадиях развития вида в полярном регионе (Arnkvaen et al., 2005). Процесс икрометания не зависит от доступности пищевых ресурсов, так как используются собственные липидные запасы, которые аккумулируются в процессе развития *C. hyperboreus* (Niehoff et al., 2002). Взрослые самки накапливают большие запасы липидов – 62,2% сухого вещества, в которых концентрация восковых эфиров составляет 75,1% общих липидов (Scott et al., 2002). Они опускаются на дно и в течение зимы откладывают плавучие яйца. Их нормальное развитие происходит через серию науплиальных и копеподитных стадий за счет больших липидных резервов (Conover, 1988). На копеподитных стадиях 4 и 5 содержание общих липидов было – 54,4 и 65,0% сухой массы, соответственно, в которых уровень восковых эфиров составлял 72,3 и 74,6%, полярных липидов – 13,5 и 11,6%, триацилглицеринов – 4,1 и 7,6%, стеролов – 3,1 и 2,0%, соответственно (Scott et al., 2002). Иногда, весной в поверхностных слоях воды можно встретить рачков на более ранних стадиях – питающихся науплиусов (стадия V – NV). Молодые формы появляются в поверхностных слоях для дополнительного питания фитопланктоном, в результате чего у них образуется резерв запасных липидов (Conover, 1988). После этого, они мигрируют на глубину 500–2000 м и входят в состояние диапаузы (Vinogradov, 1997). Такие вертикальные передвижения рачков к поверхности способствуют максимальному запасанию энергетически важных липидов для выживания в крайне неблагоприятный период года (Falk-Petersen et al., 2006).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные о значении зоопланктона в арктических экосистемах свидетельствуют о том, что эти морские беспозвоночные представляют собой энергетически богатый компонент (липиды) пищевых цепей, участвующий в передаче и трансформации вещества и энергии от более низких трофических уровней на более высокие – плотоядным рыбам, птицам. Сравнение данных в динамике дает возможность анализировать изменения трофических взаимоотношений в экосистемах. В настоящее время динамика зоопланк-

тона очень активно изучается, в том числе и в связи с проблемой глобального потепления, поэтому анализ липидного состава калянусов как объектов питания основных видов арктических рыб может служить одним из индикаторов изменений в водоемах арктического региона.

Работа поддержана грантами РФФИ 08-04-01140-а, РФФИ 08-04-098843-р_север_а, Целевая программа РАН «Поддержка молодых ученых». Программа Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4.

Литература

Aksness D.L., Miller C.B., Ohman M.D. et al. Estimation techniques used in studies of copepod population dynamics—a review of underlying assumptions // *Sarsia*. 1997. V. 82. № 4. P. 279–296.

Arnkvaen G., Daase M., Eiane K. // *Polar Biol.* 2005. V. 28. P. 528–538.

Ashjian C.J., Campbell R.G., Welch H.E. et al. Annual cycle in abundance, distribution, and size in relation to hydrography of important copepod species in the western Arctic Ocean // *Deep-Sea Res. Part II*. 2003. V. 50. P. 1235–1261.

Astthorsson O.S., Gislason A. Seasonal variations in abundance, development and vertical distribution of *Calanus finmarchicus*, *C. hyperboreus* and *C. glacialis* in the East Icelandic Current // *J. Plankton Res.* 2003. V. 25. № 7. P. 843–854.

Auel H. The ecology of Arctic deep-sea copepods (*Euchaetidae* and *Aetideidae*). Aspects of their distribution, trophodynamics and effect on the carbon flux // *Rep. Polar Res.* 1999. V. 319. P. 1–97.

Bonnet D., Titelman J., Harris R. *Calanus* the cannibal // *Jour. Plank. Res.* 2004. V. 26. № 8. P. 937–948.

Conover R.J. Comparative life histories in the genera *Calanus* and *Neocalanus* in high latitudes of the northern hemisphere // *Hydrobiologia*. 1988. V. 167. P. 127–142.

Falk-Petersen S., Dahl T.M., Scott C.L. et al. Lipid biomarkers and trophic linkages between ctenophores and copepods in Svalbard waters // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2002. V. 227. P. 187–194.

Falk-Petersen S., Hopkins C.C.E., Sargent J.R. Trophic relationships in the pelagic arctic food web. In: Barnes M, Gibson RN (eds) Trophic relationships in the marine environment // *Proc. 24th Europ. Mar. Biol. Symp.* 1990. P. 315–333.

Falk-Petersen S., Pavlov V., Timofeev S. et al. Climate variability and possible effects on Arctic food chains: The role of *Calanus* // *Arctic-alpine ecosystems and people in a changing environment*. 2006. Springer verlag. Berlin.

Gislason A., Astthorsson O.S. Seasonal development of *Calanus finmarchicus* along an inshore-offshore gradient southwest of Iceland // *Polar Biol.* 1996. V. 20. № 2. P. 85–94.

Hagen W., Auel H. Seasonal adaptations and the role of lipids in marine zooplankton // *Mar. Zoology*. 2001. V. 104. P. 313–326.

Hirche H.J. Life cycle of the copepod *Calanus hyperboreus* in the Greenland Sea // *Mar. Biol.* 1997. V. 128 (4). P. 607–618.

Hirche H.J. Egg production of *Calanus finmarchicus* at low temperature // *Mar. Biol.* 1990. V. 106. P. 53–58.

Hirche H.J., Brey T., Nieloff B. A high-frequency time series at Ocean Weather Ship Station M (Norwegian Sea): population dynamics of *Calanus finmarchicus* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2001. V. 219. P. 205–219.

Hirche H.J., Kwasniewski S. Distribution, reproduction and development of *Calanus* species in the Northeast Water in relation to environmental conditions // *J. Mar. Syst.* 1997. V. 10 (1–4). P. 299–317.

Hirche H.J., Meyer U., Nieloff B. Egg production of *Calanus finmarchicus*: effect of temperature, food and season // *Mar. Biol.* 1997. V. 127 (4). P. 609–620.

Hirche H.J., Mumm N. Distribution of dominant copepods in the Nansen Basin, Arctic Ocean, in summer // *Deep-Sea Research I*. 1992. V. 39. P. 485–505.

Hoeger U. Biochemical composition of ctenophores // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1983. V. 72. P. 251–261.

Jounson M.W. The plankton of the Beaufort and Chukchi Sea areas of the Arctic and its relation to the hydrography // *Arctic Institute of North America Technical Paper*. 1956. № 1. 34 p.

Kosobokova K.N. Diurnal vertical distribution of *Calanus hyperboreus* Kroyer and *Calanus glacialis* Jaschnov in the Central Polar basin // *Oceanology*. 1978. V. 18. P. 476–480.

Lee R.F., Hagen W., Kattner G. Lipid storage in marine zooplankton // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2006. V. 307. P. 273–306.

MacLellan D.C. 1967. The annual cycle of certain calanoid species in west Greenland // *Canadian Journal of Zoology*. 1967. V. 45. P. 101–115.

Mumm N., Auel H., Hanssen H. et al. Breaking the ice: large-scale distribution of mesozooplankton after a decade of arctic and transpolar cruises // *Polar Biol.* 1998. V. 20. № 3. P. 189–197.

Niehoff B., Hirche H.-J. The reproduction of *Calanus finmarchicus* in the Norwegian sea in spring // Sarsia. 2000. V. 85. P. 15–22.

Pasternak A., Arashkevich E., Tande K., Falkenhaug T. Seasonal changes in feeding, gonad development and lipid stores in *Calanus finmarchicus* and *C. hyperboreus* from Malangen, northern Norway // Mar. Biol. 2001. V. 138. P. 1141–1152.

Sargent J.R., Lee R.F., Nevenzel J.C. Marine waxes. In: Kolattukudy P (ed) Chemistry and biochemistry of natural waxes // Chemistry and biochemistry of natural waxes. Elsevier Press, Amsterdam, 1976. p. 50–91.

Scott C.L., Kwasniewski S., Falk-Petersen S. et al. Species differences, origins and functions of fatty alcohols and fatty acids in the wax esters and phospholipids of *Calanus hyperboreus*, *C. glacialis* and *C. finmarchicus* from Arctic waters // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2002. V. 235. P. 127–134.

Scott C.L., Kwasniewski S., Falk-Petersen S. et al. Lipids and life strategies of *Calanus finmarchicus*, *Calanus glacialis* and *Calanus hyperboreus* in late autumn, Kongsfjorden, Svalbard // Polar Biol. 2000. V. 23. P. 510–516.

Vinogradov M.E. Some problems of vertical distribution of meso-, macroplankton in the ocean // Advances in Marine Biology. 1997. V. 32. P. 1–92.

LIPID STAFF OF CALANUS – MAIN FOOD OBJECTS FOR ARCTIC FISH SPECIES (SHORT REVIEW)

S.A. Murzina, N.N. Nemova, Z.A. Nefedova

Institute of biology, Karelian Research Centre RAS, Russia, Petrozavodsk
e-mail: imagination@onego.ru

Review are presented data of last years of researchers by three species of *Calanus* – *Calanus hyperboreus*, *calanus glacialis*, *Calanus finmarchicus*. The biology of there species, their lipid staff and role in Arctic ecosystems are considered.

The special attention is given to accumulation power-intensive lipids and transfer of these components via trophic food chains during Copepoda life cycle. As zooplankton is unique link between phytoplankton and higher trophic levels (fishes, birds).

МЕХАНИЗМЫ БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ У ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ

Н. Н. Немова

*Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия
e-mail: nemova@krc.karelia.ru*

Проблема устойчивости организма, его адаптации к изменяющимся факторам среды остается одной из центральных проблем биологии. Она включает вопросы, рассматриваемые в рамках многих общебиологических дисциплин, и затрагивает ряд фундаментальных свойств живых организмов. Понятие адаптации охватывает широкий круг вопросов приспособления организма к условиям среды. Несмотря на большое разнообразие типов, уровней, механизмов адаптаций, их можно рассматривать как переходный процесс, вызванный сменой среды или отдельных ее факторов: переход живой системы любого уровня организации из одного устойчивого состояния в другое. Адаптация рассматривается как способность живых организмов приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды с одновременным повышением вероятности выживания и самовоспроизведения (Селье, 1972; Хочачка, Сомеро, 1988; Озернюк, 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Смирнов, Богдан, 2007). Адаптации к условиям окружающей среды, как универсальное биологическое явление, формируются и проявляются на самых различных уровнях организации живого. Биохимические изменения адаптивны большей частью на уровне основных метаболических функций и поэтому макроскопически не проявляются (Хочачка, Сомеро, 1988).

Жизнь в водоеме, в отличие от наземных условий, характеризуется большей зависимостью гидробионтов от факторов среды. Поэтому водные экосистемы, сообщества, организмы особо чувствительны к нарушению химического состава среды. Многие фундаментальные концепции современной биологии были установлены в процессе изучения водных организмов. Проблемы, возникающие при изменении внешних условий, и потенциальные средства, с помощью

которых данный организм может избежать вредных последствий этого изменения, непосредственно зависят от того, насколько быстро изменяется внешняя среда. Как правило, чем быстрее происходит изменение, тем сильнее будет его воздействие на организмы. Чем большим временем располагает организм для адаптации, тем более основательно он может перестроить свои фундаментальные биохимические механизмы. Высокие темпы индустриализации, в том числе северных регионов, породили целый ряд проблем, связанных с изменением качества окружающей среды. Водные организмы, как известно, являются удобными объектами при оценке степени влияния на живой организм ксенобиотиков, в том числе токсикантов, а значит, и качества среды (Немова, Высоцкая, 2004; Кашулин, 2000). Они аккумулируют неблагоприятные эффекты комплекса различных воздействий, имеют сравнительно большие размеры и продолжительность жизни, обладают устойчивостью к сублетальным воздействиям различных веществ, могут быть использованы для прогноза различного рода воздействий на водные экосистемы и здоровье человека, употребляющего их (беспозвоночных, рыбу) в пищу. На водоем обычно действует целый комплекс факторов, поэтому для анализа эффектов токсикантов требуются не только модельные эксперименты, но обязательно и натурные (в условиях природных водоемов), так как, на наш взгляд, они позволяют получить более объективную информацию о механизмах приспособления организмов к изменению условий среды. Список используемых методов для выявления эффекта различных воздействий на состояние водных экосистем довольно разнообразен. Биохимические методы позволяют наблюдать изменения в обмене веществ в организме, наступающие, как

правило, до появления физиологических, морфологических и других отклонений от нормы. С их помощью можно определить границы адаптационных способностей, фазу воздействия того или иного фактора (адаптация, предпатология, патология) и на основании этого сделать выводы о степени устойчивости и чувствительности видов (Немова, Высоцкая, 2004; Высоцкая, Немова 2008).

Следует отметить, что разработка теоретических и прикладных аспектов эколого-биохимического мониторинга водоемов по состоянию населяющих их водных организмов имеет непосредственное отношение к проблемам, решаемым в рамках приоритетного направления развития науки и техники по разделу «Рациональное природопользование», в части создания средств и методов наблюдений и оценки состояния окружающей среды, последствий хозяйственной деятельности, санитарно-гигиенических условий существования человека, нормирования допустимой нагрузки на водоемы и актуальна как с теоретической, так и с практической точек зрения.

Целью исследований, проводимых коллективом лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН является выяснение общих и специфических особенностей биохимических механизмов развития адаптивных реакций (долговременных и срочных) у рыб и водных беспозвоночных в ответ на изменение факторов среды (абиотических и биотических), в том числе в процессе индивидуального развития организмов, на примере рыб и водных беспозвоночных. Эти исследования важны как для выяснения фундаментальных механизмов развития приспособительных реакций у рыб, стоящих на различных ступенях эволюционного развития, в ответ на воздействие разнообразных факторов среды, так и для решения практических задач рационального природопользования, которое невозможно без контроля за состоянием природных сред. Сведения по обсуждаемой проблеме широко представлены в многочисленных публикациях сотрудников лаборатории биохимии (Сидоров, 1983; Сидоров и др., 1989; Сидоров и др., 2002, 2003; Немова, Высоцкая, 2004; Немова, 2005; Смирнов, Богдан, 2007; Бондарева и др., 2006; Фокина и др., 2010). В рамках данного обзора будут приведены в основном опубликованные результаты исследований последних трех лет, полученные при изучении биохимических адаптаций у водных организмов в таких процессах, как формирование фенотипи-

ческой разнокачественности молоди рыб, взаимоотношения в сообществах организмов в среде обитания, взаимоотношения в системе «паразит-хозяин», а также приспособления организмов к изменению факторов среды (солености, кислотности, токсикантов различной природы).

Исследовали роль следующих биохимических параметров клеточного метаболизма: состав липидов: общих, запасных (триацилглицеринов, эфиров холестерина), мембранных (фосфолипидов, включая их фракционный состав, а также холестерина), жирных кислот (насыщенных, ненасыщенных), общий белок, растворимый, связанный с мембранами, сывороточные белки, ферментные белки, а также состав полипептидов, в т.ч. фракции металлотioneинов; изучена роль ферментов (в т.ч. изоферментов) энергетического (углеводного) обмена, катаболизма белков, лизосомальных гидролаз, биотрансформации ксенобиотиков. Кроме того, в отдельных экспериментах исследовали такие биохимические параметры, как содержание нуклеиновых кислот, малоновый диальдегид, SH-группы белков, пептидов и ферментов и некоторые другие. Таким образом, были использованы до 50 взаимосвязанных параметров пластического и энергетического метаболизма белков, углеводов, нуклеотидов, липидов, ассоциированных с такими клеточными структурами как мембраны, лизосомы, митохондрии, цитозоль. Выполнение подобных исследований предполагает использование широкого спектра методов и подходов. Наряду с классическими биологическими методами сезонных полевых ихтиологических и гидробиологических наблюдений за состоянием исследуемых объектов в водоемах различных районов применялись, прежде всего, биохимические, а также молекулярно-генетические, физиологические, гистологические, аквариально-экспериментальные и другие методы исследований. Для решения поставленных задач использовали разнообразные методы физико-химического анализа нуклеиновых кислот, липидов, углеводов, белков, в том числе ферментов: дифференциальное центрифугирование, ионообменную и гель-хроматографию, электрофорез, спектрофотометрию, тонкослойную и газо-жидкостную хроматографию, ПЦР в режиме реального времени, а также методы, используемые в ихтиологии и гидробиологии для характеристики исследуемого материала и статистической обработки данных.

В исследованиях использовали различные виды водных организмов, такие как: атлантические

ский лосось (*Salmo salar L.*), микижа (*Salmo mykiss L.*), кижуч (*Oncorhynchus kisutch L.*), налим (*Lota lota L.*), ерш (*Gymnocephalus cernuus L.*), корюшка европейская (*Osmerus eperlanus L.*), окунь (*Perca fluviatilis L.*), моллюски – мидии (*Mtilus edulis L.*), ракообразные – веслоногие рачки (*Calanus glacialis L.*), паразитические черви (*Alcataenia larina*, *Alcataenia dominicana*, *Alcataenia armillaris*, *Cryptocotyle lingua*, *Microsomacanthus sp.*, *Tetrabothrius cylindraceus*, *Tetrabothrius Immerinus*, *Tetrabothrius jagerskioeldi*, *Triaenophorus nodulosus*), водоплавающие птицы – моевка (*Rissa tridactyla L.*), толстоклювые кайры (*Uria lomvia L.*) тонкоклювые кайры (*Uria aalge Pontop L.*), гага обыкновенная (*Somateria mollissima L.*).

Результаты исследований

1. Формирование фенотипической разнокачественности молоди рыб

Фенотипическая разнокачественность, определяющая степень варьирования того или иного признака среди особей в одной популяции, является одним из важнейших механизмов развития адаптаций организмов к постоянно изменяющимся условиям среды обитания, обеспечивающим возможности расширения ареала их обитания (Павлов и др., 2001, 2007, 2009, 2010; Казаков, Веселов, 1998). Изучение интегральных показателей энергетического и пластического обмена рыб, процессов регуляции и взаимодействия обмена белков, липидов и углеводов, а также механизмов поддержания метаболического гомеостаза при определенных условиях обитания позволяет объяснить специфику жизненного цикла рыб, их поведенческих, биохимических, физиологических и морфологических адаптаций. В наших исследованиях показана роль биохимических адаптаций молоди лососевых рыб в формировании механизмов фенотипической разнокачественности и дифференциации рыб на группы, что определяет выбор их жизненной стратегии (сроки будущей смолтификации, миграции в море и возврат на нерест).

Проводили биохимические исследования показателей метаболизма, характеризующих состояние липидного, белкового, углеводного (энергетического), минерального обмена молоди лосося (0+, 1+, 2+ и смолты), мигрирующей в притоки и остающейся в главном русле реки Варзуга после выклева с целью выяснения механизмов формирования различного ее поведения. Образ жизни обеих групп молоди примерно

одинаков, но те личинки, которые мигрируют в притоки мелких рек и ручьев, более активны. Сравнимые биотопы имеют разные трофические и температурные условия. При исследовании биохимических адаптаций у молоди лосося, обитающей в р. Варзуга и ее притоке Ареньге (Терский берег Белого моря) были обнаружены различия в активности некоторых ферментов энергетического и углеводного метаболизма, а также ферментов протеолиза и лизосомальных гидролаз у сеголеток (0+) и годовиков (1+) лосося, обитающих в русле и в притоке (Высоцкая и др., 2004; Павлов и др., 2007, 2008; Кяйвяряйнен и др., 2007). Гидробиологический анализ кормовой базы притока Ареньга, свидетельствует о более высоком ее качестве, чем в русле реки. Показано, что сеголетки (0+) лосося, обитающие в притоке имеют более высокий уровень энергетического обмена и утилизации углеводов в энергетических и пластических целях по сравнению с сеголетками из русла реки. При исследовании годовалой молоди (1+) из русла и притока не было обнаружено достоверных различий в исследованных показателях, т.к. условия обитания в притоке для нее не столь благоприятны, как для сеголеток, что объясняется особенностями кормовой базы притока. Аналогичные тенденции в изменении активности выявлены и для активности протеиназ (кальпаинов и катепсинов), лизосомальных гидролаз (кислой РНКазы, ДНКазы, β -глюкозидазы, β -галактозидазы, кислой фосфатазы), а также щелочной фосфатазы и альдолазы, подтверждающие наличие разнокачественности молоди лосося из различных микробиотопов. В частности, при сравнении двух групп выловленных сеголеток, различающихся физиологическими характеристиками (вес, выживаемость) следует отметить, что в группе более активных особей, мигрировавших из мест нереста в притоки отмечается значительное увеличение кальцийактивируемой протеолитической активности (во фракциях μ - и m -кальпаинов и, как следствие, значительный рост суммарной активности в 1,3 раза) (Павлов и др., 2007; Кяйвяряйнен и др., 2007). Следует отметить более чем 10-кратную разницу в активности m -кальпаина у молоди из притока Ареньга и главного русла Варзуга (порог Ареньгский). Сопоставление уровня активности кальпаинов с содержанием арахидоновой кислоты в аналогичных пробах выявляет однонаправленную тенденцию изменения этих показателей. Уровень арахидоновой кислоты увеличивается с августа по октябрь в 1,5 раза у сеголеток из притока

Ареньга, а в главном русле у прибрежной группировки сеголеток увеличивается незначительно (в 1,14 раза). Активность кальпаинов возрастает у сеголеток из притока Ареньга с августа по октябрь почти в 2 раза, а у мальков лосося из главного русла – незначительно (в 1,1 раза). Наблюдаемая корреляция содержания арахидоновой кислоты (АК) и уровня активности кальпаинов может быть связана с участием АК, являющейся эффектором освобождения кальция, в процессах регуляции проницаемости Ca^{2+} -каналов. АК является важным компонентом клеточных мембран (Chilton, 1989), входит в состав ряда фосфолипидов (фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин), участвующих в передаче сигнала с клеточной поверхности в цитоплазму. Связывание многих лигандов на клеточной поверхности приводит к активации фосфолипаз, которые либо непосредственно высвобождают АК, либо гидролизуют фосфолипид до ДАГ, а АК высвобождается уже в процессе метаболизма последнего (Rittenhouse-Simons, 1980). Арахидоновая кислота в различных типах клеток может менять проницаемость плазматической мембраны для различных ионов и, в свою очередь, вызывает выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо и его поступление из межклеточной среды, увеличивая концентрацию свободных ионов кальция в цитоплазме. При возрастании в цитозоле концентрации кальция комплекс кальпаин-кальпаистатин (ингибитор) распадается (Rittenhouse-Simons, 1980), следствием чего является активация кальпаинов. Следовательно, обнаруженная корреляция уровня активности кальпаинов и содержания арахидоновой кислоты может быть вызвана эффекторной функцией АК, связанной с увеличением концентрации ионов кальция в цитоплазме. В спектре тканевых фосфолипидов уровень содержания фосфатидилинозитола как регулятора уровня Ca^{2+} в цитоплазме клетки привлекает особое внимание. Активация гидролиза фосфоинозитидов приводит к открыванию Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны (Michel, 1975). Таким образом, кинетика образования метаболита фосфатидилинозитола – ИФ₃ коррелирует с высвобождением Ca^{2+} из внутреннего депо, а также с входом внеклеточного Ca^{2+} снаружи в цитоплазму (Berridge, Irvine, 1989), что приводит к росту концентрации внутриклеточного кальция. Следует отметить, что динамика изменения фосфатидилинозитола в составе фосфолипидов у сеголеток в обоих микробиотопах имеет однонаправленную тенденцию к уменьшению с авгу-

ста по октябрь, что может косвенно свидетельствовать о его расходовании, и о приросте содержания метаболита фосфатидилинозитола – ИФ₃, что приводит к росту концентрации внутриклеточного кальция и, соответственно, к активации кальпаинов.

Возможно, метаболические пути фосфоинозитидного обмена, эффекторные функции арахидоновой кислоты, влияющие на уровень внутриклеточного кальция и, соответственно, на активность кальпаинов, одного из регуляторных ферментов белкового обмена, связывают липидный и белковый метаболизм.

Результаты изучения содержания и соотношения фракций липидов и жирных кислот у молоди атлантического лосося (*Salmo salar*) в зависимости от возраста и места нагула (р. Варзуга, приток Ареньга) свидетельствуют о том, что возрастная динамика липидного статуса молоди атлантического лосося характеризуется повышением уровня ПНЖК – 20:4n-6, 20:5n-3 и 22:6n-3, и понижением содержания энергоемких ТАГ, а также ХС, ЭХС и суммы моноеновых ЖК, что свидетельствует об усилении метаболизма, связанного с процессом смолтификации и подготовкой к обитанию в морской среде. Повышение уровня ФС (наиболее эффективного регулятора активности Na^+/K^+ -АТФазы – ключевого фермента осморегуляции) у пестряток 1+ и особенно у смолтов может быть связано с формированием одного из биохимических механизмов преадаптации рыб к морской среде обитания.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что мигрирующая в притоки молодь изначально более «благополучна» по биохимическому состоянию, более активна, метаболические процессы у нее протекают активнее за счет более высокого уровня аэробного метаболизма, биосинтетических процессов, накопления питательных веществ на фоне хороших кормовых условий в притоках. В основе различий группировок молоди лосося лежит разный уровень биохимического статуса молоди 0+, что может определять их миграционное состояние из главного русла реки Варзуга в исследуемые притоки. Скорее всего, такие различия обусловлены адаптивными перестройками метаболизма.

Исследования липидного статуса икры кумжи (*Salmo trutta*) на стадии пигментации глаз (Ладожское озеро) и обработка данных методом главных компонент показали их пространственную дифференцировку: выделяются две группи-

ровки, различающиеся содержанием общих липидов (величина нагрузки на первую компоненту), суммарных фосфолипидов (на вторую компоненту) и несколько образцов икры с разными нагрузками на отдельные липиды. Установленная разнокачественность икры кумжи может являться предпосылкой дифференцировки молоди рыб и в постэмбриональном развитии, определяя ее дальнейшее поведение.

Проведенные ранее исследования на камчатских популяциях молоди лососевых рыб (Кириллов, 2007; Кириллова, 2008) показали, что среди сеголеток микижи *Parasalmo mykiss* и кижуча *Oncorhynchus kisutch* в период первичного расселения происходит разделение на две группировки: покатные и прибрежные, которые отличаются по длине и массе. При исследовании биохимических механизмов разнокачественности молоди микижи и кижуча, обитающих в реке Утхолок (Западная Камчатка), было обнаружено, что молодь рыб по липидным спектрам можно условно разделить на две группы с низким (I) и высоким (II) содержанием общих липидов. Вторая группа рыб отличалась более высоким уровнем почти всех липидных фракций – триацилглицеринов, фосфолипидов (ФИ, ФС, ФЭА, ФХ, ЛФХ), холестерина, его эфиров, показателем ТАГ/ФЛ (Павлов и др., 2007, 2010). Выявленные различия между покатными и прибрежными сеголетками микижи и кижуча могут являться основой для формирования в дальнейшем (в возрасте 1+) устойчивой дифференциации рыб на группы с разным липидным статусом. Липидный статус представляется наиболее показательным критерием дифференциации, т.к. является прямым показателем интенсивности обменных процессов рыб и косвенным показателем условий обитания представителей отдельных групп.

Таким образом, фенотипическая разнокачественность представляет собой результат сложного взаимодействия биохимических, физиологических, поведенческих, экологических и других механизмов дифференциации особей в одной популяции. Ведущим механизмом формирования внутривидовой фенотипической изменчивости лососевых рыб является вариабельность уровня метаболических составляющих энергетического и пластического обмена особей, возникающая на самых ранних этапах онтогенеза, что определяет дальнейшее становление внутривидового разнообразия вида, специфику жизненной стратегии, сроки смолтификации и возврата на нерест.

2. Влияние солености и кислотности среды на активность ферментов осморегуляции и протеолиза молоди рыб

Особенностью экологии эвригалинных видов является то, что в своем жизненном цикле они могут сталкиваться со значительными изменениями абиотических факторов среды обитания, в частности, солености и кислотности. Успех адаптации зависит от способности рыб переорганизовать свой водно-солевой обмен. Целью ионной регуляции организмов является поддержание во внутренней среде наиболее благоприятного соотношения ионов, необходимого для нормального функционирования макромолекул в клетках. Включение адаптационных механизмов затрагивает также и лизосомальную систему клетки, в частности, такая адаптация кроме синтеза новых ферментов, соответствующих изменившимся потребностям организма, ведет к распаду и удалению тех ферментов, которые больше не нужны для ее нормального функционирования, регулируя, тем самым, высокую избирательность внутриклеточного протеолиза (Мосолов, 1988).

Известно, что стерлядь, *Acipenser ruthenus* L., выдерживает значения солености среды обитания до 10‰, тогда как для большинства представителей пресноводной ихтиофауны критическими являются значения выше 5–8‰ (Хлебович, 1974). Исследуемый диапазон кислотности среды (рН от 7,0 до 9,0) находится в пределах адаптативной нормы для стерляди. Учитывая генетическую близость стерляди к проходным осетровым, представляет интерес более глубокое раскрытие эффективных механизмов регуляции ионно-солевого и белкового обмена для поддержания устойчивости метаболизма в связи с проблемой возможной акклиматизации. Сравнительные исследования показателя активного транспорта ионов – Na^+/K^+ -АТФазы и лизосомальных протеолитических ферментов – катепсинов В и D расширяют представления о биохимических механизмах адаптации стерляди к изменению солености и кислотности окружающей среды. Результаты исследований указывают на приспособительный характер реактивности ферментов активного транспорта ионов Na^+ и K^+ и лизосомальных ферментов – катепсинов В и D при изменении солености и рН среды обитания стерляди в диапазоне докритических значений. Полученные данные и сделанные на их основе выводы продемонстрировали, что активность Na^+/K^+ -АТФазы стерляди находится в прямой зависимости от солености внешней среды (в ди-

апазоне до 6‰) и в обратной зависимости от увеличения рН среды (при изменении рН от 7,0 до 9,0) (Крупнова и др., 2008, 2009; Кяйвярйнен и др., 2008). Анализируя данные по изменению активности исследованных протеиназ (каптепсинов), можно предположить, что они являются свидетельством усиления деградации белкового метаболизма в ответ на воздействие повышенных концентраций соли и значений рН. Изменение активности исследуемых ферментов может служить примером биохимической адаптации, направленной на поддержание механизмов обмена веществ и его изменений в зависимости от непостоянных условий среды.

Ранее были проведены исследования влияния изменения солености среды обитания на мидий *Mytilus edulis* Белого моря. Результаты исследований показали адаптивный потенциал метаболизма мидий при изменении солености среды. Изменчивость 45–60 показателей биохимического метаболизма у мидий *Mytilus edulis* и амфипод *Gammarus* sp. Белого моря в условиях критически низкой солености (5 ‰) свидетельствуют об адаптивных перестройках, сопровождающихся снижением проницаемости мембран, изменением активного транспорта ионов, возрастанием аэробных путей окисления углеводов, обусловленного, по-видимому, необходимостью усиления синтеза АТФ для обеспечения процессов осморегуляции, усилением процессов внутриклеточного протеолиза. Также было показано, что значительное опреснение среды угрожает стабильности обменных процессов на клеточном уровне, а следовательно, и благополучию организма в целом, в большей степени, чем повышенная соленость. Адаптивные возможности клеточного метаболизма при распреснении снижаются, и возможны патологические изменения в организме, о чем свидетельствует изменение активности кальций-зависимых протеиназ цитозоля и содержания мембранных (фосфолипидов) и запасных (триацилглицеридов) липидов. Эти изменения характеризуют нарушение процессов осморегуляции. Преадаптированность литоральной группы мидий к обитанию в прибрежной зоне с неустойчивым температурным, соленостным и кислородным режимом выражается в повышенной их устойчивости к гипоксии и факультативному анаэробнозю, сопровождающим ответную реакцию на резкие колебания факторов среды. Результаты исследований, полученные в содружестве с И. Н. Бахметом и В. В. Халаманом, отражены в многочисленных публикациях (Бондарева и др., 2006;

Fokina, 2006; Амелина и др., 2006; Амелина, Высоцкая, 2009; Ткач, Высоцкая, 2007; Ткач и др., 2007; Фокина и др., 2007, 2008, 2010).

3. Взаимоотношения в сообществах организмов в среде обитания

Как известно, ход сукцессии морских эпибиозов, как и наземных экосистем, находится под влиянием множества факторов, как абиотических, так и биотических. Одним из важнейших компонентов этого комплекса являются взаимоотношения видов, слагающих сообщество обрастания. Наименее изученным аспектом конкурентных отношений в сообществах обрастания является аллелопатия (от греч. *allelon* – взаимно и *pathos* – страдание) – негативное влияние одних организмов на другие с помощью химических соединений. Эффект, оказываемый вторичными метаболитами гидробионтов на конкурентов, может быть самым разнообразным. Токсическое действие может проявляться в подавлении роста и развития других обрастателей, препятствовании оседанию и прикреплению личиночных форм в борьбе за субстрат (Халаман, 2008; Green, 2002; Dobretsov, 2004). Наличие механизмов химической защиты описано, в основном, для низкоорганизованных видов – асцидий и губок.

Эксперименты проводились в 2005–2007 гг. на базе ББС ЗИН РАН «Картеш» И. Н. Бахметом, В. С. Амелиной, Н. Н. Фокиной под руководством д.б.н., ст.н.с. биостанции В. В. Халамана. Объектом исследования являлись мидии, собранные с обрастаний искусственных субстратов в бухте «Круглая» вблизи указанной биостанции. Моллюсков акклимировали к лабораторным условиям в течение короткого времени (не более двух суток) во избежание голодания моллюсков, т.к. кормление экспериментальных мидий не осуществлялось и единственным источником питания для них служили органические вещества, содержащиеся в природной морской воде. Затем добавляли профильтрованную морскую воду, в которой предварительно в течение 2 суток содержали представителей одного из 5 видов, являющихся основными компонентами сообществ обрастания Белого моря: мидия съедобная *Mytilus edulis* L., двусторчатый моллюск *Hiatella arctica* L., асцидия *Styela rustica* L., морская звезда *Asterias rubens* L. и губка *Halichondria panicea* Pallas. Экспозиция составляла 24 часа. Контролем служили моллюски, сохранившиеся в природной морской воде. В тканях мидий определяли содержание белка, активность лизосомальных (кислая фосфатаза,

РНКаза, ДНКаза, β -глюкозидазы, β -галактозидазы, катепсины В и D) и цитозольных (щелочная фосфатаза, альдолаза) ферментов, а также активность основного фермента осморегуляции – Na^+/K^+ -АТФазы. Исследовались гомогенаты цельных мидий, жабр, дистального и проксимального отдела мантии моллюсков.

Было показано, что развитие ответной реакции организма на биохимическом уровне может быть одним из важных механизмов аллелопатических взаимодействий основных компонентов сообществ обрастания Белого моря (*Halichondria panicea*, *Styela rustica*, *Hiatella arctica*, *Asterias rubens*, *Mytilus edulis*) (Амелина и др., 2006, 2007). Степень «ответа» на присутствие в среде обитания продуктов, экскретируемых другими организмами, зависит от времени экспозиции исследуемых объектов в среде с экскреторно-секреторными продуктами (ЭСР). Таким образом, обобщение результатов двухлетней работы позволяет ранжировать исследованные виды обрастателей по степени выраженности аллелопатического действия по отношению к *Mytilus edulis*. Как и следовало ожидать, дистантные формы конкурентной борьбы с помощью химических соединений отмечены для низкоорганизованных организмов – асцидии и губки. Значительное воздействие на метаболизм мидий секреторно-экскреторных продуктов морской звезды имеет иную направленность, стимулируя, по всей видимости, преимущественно поведенческие защитные реакции у подопытных моллюсков – замыкание раковины и укрепление её створок в присутствии хищника. Наименее «агрессивными» с точки зрения аллелопатии для мидии съедобной являются представители своего же вида, а также другой двустворчатый моллюск – *Hiatella arctica*. Наименьшее отклонение от контроля наблюдается при экспонировании мидий в воде, кондиционированной представителями своего же вида, что позволяет говорить о слабой выраженности химической составляющей в механизмах внутривидовой конкуренции. Следует отметить, что такого рода исследований до настоящего времени не проводилось, в то время как результаты могут внести вклад в выяснение механизмов взаимодействий между организмами и иметь важное значение при разработке фундаментальных основ экологической биохимии и биохимической экологии. Материалы по этим экспериментам к настоящему времени обобщены и подготовлены Амелиной В. С. и Халаманом В. В. к публикации в журнале.

4. Эволюционные аспекты биохимических адаптаций в системе «паразит–хозяин»

Паразитарная инвазия является одним из существенных факторов, влияющих на численность видов хозяев, и, соответственно, на структуру и функционирование экосистем. Для понимания структуры отношений между компонентами системы «паразит–хозяин» необходимо изучение морфологических и гистологических особенностей строения паразита и хозяина, приспособления гельминтов к обитанию в среде первого и второго порядка, их жизненных циклов и географического распространения. Особый вклад вносят биохимические исследования, которые позволяют расширить представления о взаимоотношениях паразита и хозяина (Сидоров и др., 1989; Давыдов, 1991; Sajid, 2002; Thomas, 2002; Dzik, 2006; Barrett, 2009). Для системы «паразит–хозяин» свойственен антагонизм (Давыдов, 1991). Паразит использует хозяина в качестве среды обитания и источника питания, адаптируясь соответствующим образом к его биохимическим особенностям, поскольку, как известно, гельминты не способны самостоятельно синтезировать многие вещества (Давыдов, 1991). В тоже время инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей, направленные на избирательное поглощение питательных веществ, и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в органах. В связи с этим развивается ответная реакция хозяина, направленная на поддержание функционирования зараженных органов, т.е. компенсацию паразитарного воздействия. В ходе эволюции взаимная адаптация в системе «паразит–хозяин» привела к установлению динамического равновесия между составляющими ее компонентами.

Было изучено влияние паразитарной инвазии плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus* на липидный состав печени налима *Lota lota* (Васильева и др., 2007). Развиваясь в организме хозяина, плероцеркоиды оказывают на него определенное воздействие, характер которого зависит от физиологических и биохимических особенностей гельминтов и во многом определяется активностью иммунной системы и компенсаторными реакциями зараженных органов в организме хозяина (Пронина, 1988; Давыдов, Микряков, 1988). Анализ липидного состава паразитов и зараженного органа характеризует взаимоотношения гельминтов *Triaenophorus nodulosus* и налима как антагонистические. Плероцеркоиды для своего развития используют необходимые

соединения из печени налима, нарушая при этом ее работу, что активизирует компенсаторную реакцию зараженного органа для нормализации функциональной активности. Подробнее эксперимент описан в статье О. Б. Васильевой с соавторами, представленной в этом сборнике.

При изучении влияния гельминтной инвазии на биохимические показатели моевок и кайр Баренцева моря было показано, что ферменты лизосом (нуклеазы, протеазы, фосфатаза, гликозидаза, галактозидаза) и Na^+/K^+ -АТФаза (мембраносвязанный фермент, влияющий на их проницаемость) участвуют в механизмах развития защитной реакции птиц Баренцева моря на гельминтную инвазию паразитами сем. Tetrabothridae и сем. Hymenolepididae (Высоцкая и др., 2010). Направленность и амплитуда изменений изученных показателей зависели от вида гельминта, особенностей экологии и специфичности хозяина. Наиболее сильные изменения активности изученных ферментов отмечены в печени птиц, зараженных паразитами сем. Hymenolepidida. На биохимическом уровне негативное воздействие гельминтной инвазии проявляется снижением биосинтетических процессов в печени, активацией деструктивных реакций с участием лизосомальных гидролаз и включением механизмов, повышающих проницаемость мембран для ионов и различных метаболитов. Это подтверждают данные по снижению количества общего белка и угнетению активности нуклеаз в печени зараженных кайр и моек. Подобная реакция отмечалась при многих гельминтозах человека и животных, в том числе у морских птиц (Куклин, Куклина, 2005; Куклина, 2006). В то же время, выявленное в ряде сравниваемых вариантов повышение удельной активности кислой фосфатазы, гликозидаз и катепсинов свидетельствует о превалировании деструктивных процессов в организме зараженных птиц. Различия в ответной реакции исследованных видов на присутствие в них паразитов могут быть связаны с их разными пищевыми предпочтениями. Именно характер питания определяет видовое разнообразие гельминтофауны, экстенсивность и интенсивность инвазии паразитами их хозяев. Моевки по характеру питания относятся к полифагам. Специализируясь на рыбном откорме, они могут потреблять также моллюсков и ракообразных, являющихся промежуточными хозяевами паразитов. Для представителей чистиковых птиц – тонкоклювой и толстоклювой кайр характерно крайне незначительное видовое разнообразие гельминто-

фауны, поскольку они питаются преимущественно высокостайными пелагическими видами рыб. По этой причине кайры свободны от гельминтов, жизненные циклы которых связаны с прибрежными экосистемами (Куклин, Куклина, 2005). В данной работе исследованные кайры были заражены только цестодами, а моевки – цестодами и трематодами. Следует указать, что состав цестодофауны двух близких видов кайр, ареалы которых перекрываются, также различается. Это обусловлено особенностями в их экологии. Тонкоклювые кайры – выраженные стенофаги, основу их рациона составляет рыба, а толстоклювые кайры более пластичны в кормовом отношении, их спектр питания шире и включает наряду с разными видами рыб, ракообразных, с которыми в них попадают неспецифичные паразиты. Заражение неспецифичными для данных хозяев паразитами в последнее время наблюдается на побережье Баренцева моря в результате резкого сокращения численности популяций видов рыб – традиционных объектов питания кайр, связанного с интенсивным рыбным промыслом. В сложившихся условиях иктофаги вынуждены переключаться на питание другими рыбами, через которых по пищевой цепи заражаются паразитами. Возможно, выявленные различия в реакции лизосомальных гидролаз в печени толстоклювых и тонкоклювых кайр на цестодную инвазию объясняются недостаточной «пригнанностью» биохимических структур в системе «паразит–хозяин» при неспецифическом паразитировании. Направленность и амплитуда изменения изученных показателей зависела от вида гельминта, особенностей экологии и специфичности хозяина.

5. Биохимические адаптации у водных организмов к действию токсикологических факторов

В числе исследований последних лет по биохимическим адаптациям у гидробионтов были изучены механизмы ответной реакции организмов (состав и активность определенных биохимических компонентов) на различные концентрации загрязняющих веществ разной природы (тяжелых металлов, нефтяных и иных органических загрязнителей): влияние загрязнения водоема отходами медно-никелевого комбината на состояние рыб, влияние накопления меди и кадмия на биохимический статус мидий (аквариальный эксперимент), влияние накопления ртути в тканях рыб на биохимические показатели окуня *Perca fluviatilis* L., влияние нефтепродуктов на биохимический статус мидий, влияние

компонентов буровых растворов на ферментативный статус семги, влияние нефтяного загрязнения на водоплавающих птиц из Белого и Норвежского моря, изменение активности ферментов трансформации ксенобиотиков в печени гаги обыкновенной *Somateria mollissima* под влиянием комплексного загрязнения гнездовых. В рамках данного обзора ограничимся лишь несколькими обобщающими заключениями, т.к. подробнее результаты экспериментов приведены в соответствующих публикациях (Крупнова и др., 2006, 2007, 2009; Немова и др., 2006; Bakhmet, 2009; Bondareva, 2007; Немова, 2007, 2008; Ткач, Высоцкая, 2007; Высоцкая и др., 2006, 2007, 2009; Немова и др., 2007; Amelina, 2008; Camus et al., 2008; Канцерова и др., 2009а, б; Кяйвяряйнен и др., 2009; Borvinskaya et al., 2009, 2010; Kantserova et al., 2010).

Все возрастающее антропогенное загрязнение различных экосистем, в том числе морских, делает актуальным изучение механизмов воздействия тяжелых металлов на организмы. Тяжелым металлам свойственны высокая биологическая активность, способность к аккумуляции в организме без уменьшения токсичности, легкость биопереноса в окружающей среде. Одними из наиболее удобных объектов для изучения влияния ксенобиотиков, в том числе тяжелых металлов, признаны морские беспозвоночные. В сравнении с позвоночными животными многие виды моллюсков обладают слаборазвитой способностью к биотрансформации ксенобиотиков. Важные характеристики мидий как объектов токсикологических исследований – высокая способность к аккумуляции загрязнителей из среды в тканях и сравнительно низкая активность системы цитохрома P 450.

Аквариальный эксперимент был выполнен на одноразмерных мидиях *Mytilus edulis* L., отловленных на сублиторали в губе Чупа Кандалакшского залива Белого моря. Исследовали активность ферментов метаболизма белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, а также количественные изменения в составе НМ пептидов мускулатуры рыб. Было продемонстрировано (как и в ранних работах), что биохимический статус исследуемых организмов зависит от концентрации металла, времени воздействия и природы действующего металла, определяющей специфичность его действия, динамику аккумуляции и перераспределения в организме. При разных разведениях изученных металлов и в зависимости от органа, выявлены различные реакции активности исследуемых ферментов. Было

установлено, что критическим фактором выживания организмов являются не уровни содержания катионов, а то, с чем они взаимодействуют – с металлотионеинами и другими серосодержащими низкомолекулярными молекулами или с ферментами. Количественные и тем более качественные изменения в спектре высокомолекулярных белков, как в наиболее консервативной системе, происходят в последнюю очередь, потому что любые ее повреждения могут привести к существенным нарушениям гомеостаза в организме, в результате которых развиваются различные патологии, а при длительной интоксикации наступает гибель организма (Высоцкая, 2006; Канцерова и др., 2009а, б; Bondareva et al., 2007; Nemova, 2007; Kantserova et al., 2010; Borvinskaya et al., 2010). В данном сборнике статей представлены экспериментальные статьи сотрудников лаборатории экологической биохимии М. Ю. Крупновой с соавторами и Е. И. Кяйвяряйнен с соавторами по влиянию тяжелых металлов на гидробионтов.

Несмотря на то, что в Северо-Западном регионе России нет источников значительного выброса ртути в окружающую среду, соединения ртути обнаруживаются в воде, донных отложениях водоемов и тканях гидробионтов. В Республике Карелия заболоченность водосборов пресных водоемов обуславливает специфику их гидрохимии – высокое содержание гуминовых веществ и водородных ионов, усугубляя проблему ртутного загрязнения (Немова, 2005). В Карелии наиболее удачным объектом для мониторинга ртутного загрязнения пресных вод и изучения биологических эффектов ртути на биохимическом уровне является окунь *Perca fluviatilis* L. *Во-первых*, в экосистемах многочисленных малых озер именно окунь завершает трофическую цепь; *во-вторых*, этот вид весьма устойчив к закислению водоема, продолжая существовать в озерах с pH воды ниже 4,0; кроме того, окунь представляет собой популярный объект спортивного рыболовства, а значит, может быть источником интоксикации человека соединениями ртути (Комов и др., 2004). Для изучения биохимического ответа рыб на сочетанное действие накопления ртути при сопутствующей ацидификации и гумификации водоема, в сотрудничестве с В. Т. Комовым (Институт биологии внутренних вод РАН) было проведено сравнительное исследование биохимического статуса окуней *Perca fluviatilis* L. с различным содержанием ртути в мышцах, отловленных из ряда водоемов Северной Карелии (Лоухский р-он): оз.

Кривое, оз. Среднее, оз. Круглое и оз. Жемчужное. Водосбор указанных озер находится на заболоченной территории, что обуславливает особенности их гидрохимии. Все водоемы по количеству первичной продукции олиготрофны, характеризуются высокой цветностью воды, низкой минерализацией и несколько пониженным рН (5,9–7,4). Озера Среднее, Круглое и Кривое относятся к типичным малым бессточным озерам. Озеро Жемчужное превосходит остальные водоемы по размерам, является проточным и располагается западнее остальных, ближе к населенным пунктам, у окуней, выловленных в данном водоеме, наблюдается повышенный уровень соединений ртути (табл.).

Содержание ртути в мышечной ткани окуней из озер Северной Карелии

Водоем	Концентрация Hg в мышцах рыб, мг/кг сырой массы
Оз. Среднее	0,14 (0,09–0,19)
Оз. Круглое	0,14 (0,09–0,22)
Оз. Кривое	0,14 (0,06–0,31)
Оз. Жемчужное	0,37 (0,21–0,63)

Концентрацию соединений ртути в мышцах рыб определяли сотрудники ИБВВ РАН (пос. Борок) с помощью метода атомной абсорбции холодного пара с использованием резонансной линии 253,7 нм на анализаторе ртути «Юлия-2» (Назаренко и др., 1986).

При оценке биологических эффектов ртути в качестве индикаторных показателей использовали широкий спектр ферментов и липидов, позволяющих выявить изменения ключевых обменных процессов. Результаты изучения в тканях рыб (печень, жабры, мышцы и гонады) активности ряда лизосомальных (кислой фосфатазы, РНКазы, ДНКазы, β -глюкозидазы, β -галактозидазы, катепсинов В и D) и цитоплазматических (щелочной фосфатазы, альдолазы, кальпаинов) ферментов, мембраносвязанного фермента Na^+/K^+ -АТФазы, а также содержания белка показывают, что в организме окуней с разным содержанием ртути наблюдаются различия в содержании белка и в уровнях активности исследуемых ферментов, что отражает процесс вовлечения лизосомального аппарата рыб в развитие адаптивных реакций в ответ на аккумуляцию ртути в организме (Высоцкая и др., 2007; Немова и др., 2007; Кяйвяряйнен и др., 2009; Крупнова и др., 2009; Vorvinskaya et al., 2009). Цистеин-зависимые ферменты – мишень для токсического действия ртути, ионы которой взаимодейст-

вуют с тиоловыми группами их активных центров, тем самым лишая их каталитической активности. Даже незначительные концентрации обладают ингибирующим действием на метаболизм клетки и, соответственно, на активность Ca^{2+} -зависимой протеолитической системы. Согласно полученным данным, самки характеризуются большим разнообразием молекулярных форм цистеиновых кальцийактивируемых протеиназ цитозоля (кальпаинов) в ткани печени, чем самцы, что лишним раз свидетельствует в пользу повышенной устойчивости данного пола к неблагоприятным воздействиям. Повреждающее действие соединений ртути на молекулярном уровне проявляется в ингибировании ферментов, необратимых конформационных изменениях (белков, нуклеиновых кислот) и, как следствие, изменении скорости процессов метаболизма и синтеза, возникновении мутаций. На клеточном уровне такие изменения вызывают дефицит жизненно важных метаболитов, нарушают структуру и проницаемость клеточных мембран. Очевидно, что наличие большого количества разнокачественных белков со сходной ферментной активностью позволяет осуществлять катализ в широком диапазоне параметров микросреды клетки, таких как рН, ионный состав, доступность субстрата, присутствие эффекторов и др. И наоборот, выпадение активности тех или иных молекулярных форм фермента накладывает определенные ограничения на осуществление тех или иных биохимических реакций, снижая, тем самым, вероятность эффективной компенсации внешних воздействий. Ранее (2000–2006 гг.) было показано, что ответная реакция организма на накопление ртути зависит не только от концентрации ее в органах и тканях, но и от таких сопутствующих факторов, как рН и гумифицированность водоема (Комов и др., 2004; Немова, 2005). Несмотря на повышенные концентрации ртути у окуня из оз. Жемчужное (нейтральные значения рН), изменения энзиматического статуса свидетельствует о том, что в данном случае имеет место компенсаторная реакция, в отличие от патологической реакции аккумуляции ртути у окуней из высокоацидных водоемов Суоярвского р-на и Вологодской обл., исследованных нами ранее (Немова, 2005).

Среди разнообразных видов воздействия на биоту одним из самых опасных является химическое загрязнение водоемов, которое связано с поступлением в воду материалов и реагентов, используемых при проведении разведочных и

эксплуатационных буровых работ, а также с технологическими отходами, такими как буровые растворы, шлам, буровые сточные воды, химические реагенты для обработки шламов и нефтепродукты (Рыбина, 2004). Наиболее токсичными являются буровые растворы – сложные смеси компонентов, облегчающих бурение при высокой температуре и повышенном давлении, предохраняющие буровое оборудование от коррозии, позволяющие сохранять целостность стенок скважины, регулировать вязкость и водоотдачу и т. д. В их составе есть органические и неорганические вещества, тяжелые металлы, ПАВ, пеногасители, смазочные добавки, биоциды. Буровые растворы могут быть на углеводородной и водной основе. Последние являются более безопасными и поэтому предпочтительны с экологической точки зрения. Установлено, что отдельные компоненты буровых растворов оказывают отрицательное влияние на фито- и зоопланктон, бентос, икру, личинок и молодь рыб и других животных (Сидоров и др., 2002; Борковский, 1990; Немова, Высоцкая, 2004). Все это обуславливает высокие требования к экологической безопасности материалов и реагентов, применяющихся при буровых работах, и ставит перед необходимостью определять предельно допустимые концентрации каждого из компонентов буровых растворов. Исследования влияния компонентов буровых растворов на активность лизосомальных ферментов у молоди семги показали, что они вызывают адаптивные преобразования ферментных систем, осуществляющих защитные реакции, регулирующих метаболизм, ответственных за рост и энергообеспечение организма молоди лосося. Следует заметить, что токсичность исследуемых реагентов не очень высока, так как под их влиянием вариabельность изученных биохимических показателей не выходит за рамки естественной изменчивости. Ранее (Сидоров и др., 2002; Немова, Высоцкая, 2004) при исследовании влияния компонентов буровых растворов на биохимический статус речной камбалы был предложен т.н. «интегральный биохимический индекс» (ИБИ), который позволил с учетом степени отклонения от естественных границ вариabельности изученных 50 биохимических показателей и признаков оценить эффекты воздействий поллютантов.

Для морских экосистем Европейского севера существенным источником ксенобиотиков является разработка и эксплуатация нефтегазовых месторождений шельфа Северного Ледовитого океана, неизбежно сопровождающаяся загрязне-

нием окружающей среды как непосредственно нефтепродуктами, так и буровыми растворами. Нефтяные разливы в море могут произойти на любом из этапов добычи, хранения или транспортировки нефти. Согласно оценкам некоторых международных природоохранных организаций, аварийные разливы нефтепродуктов составляют не более 5% нефти, попадающей в мировой океан, однако именно аварии танкеров наносят наибольший ущерб окружающей среде (WWF International Arctic Programme, 2007). Двустворчатые моллюски, профильтровывая большие массы загрязненной морской воды, пропускают через себя значительные количества поллютантов. Часть из них накапливается в организме мидий, подвергается биодеградации под действием микрофлоры кишечника или метаболических систем самих моллюсков, что позволяет рассматривать мидий как активных участников процесса самоочищения нефтесодержащих морских вод. Влияние нефтепродуктов на морские организмы исследовали на мидии съедобной *Mytilus edulis* L. в экспериментальных условиях на Беломорской биологической станции ЗИН РАН «Картеш» И. Н. Бахмет и Н. Н. Фокина (Bahmet et al., 2009; Фокина и др., 2009). Показано, что под влиянием нефтепродуктов в организме мидий происходят адаптивные сдвиги активности лизосомальных ферментов и кальпаинов цитозоля, направленные на утилизацию и биотрансформацию нефтепродукта, а также обеспечение процессов жизнедеятельности в токсичной среде. Изменение активности ферментов зависело от дозы испытуемого вещества и специфики выполняемой органом моллюска функции. Изменения в количественном составе структурных липидов и жирных кислот у мидий могут оказывать влияние на активность мембранно-связанных ферментов, а также на метаболизм клетки, что позволяет им адаптироваться к высоким концентрациям нефтепродуктов в морской воде.

Хроническое отравление акватории небольшими концентрациями компонентов нефти позволяет местным экосистемам адаптироваться к воздействию. В то же время, одномоментный выброс большого количества нефти способен привести к коллапсу всей экосистемы. Больше всего при разливах нефти страдают морские птицы. Водоотталкивающее оперение водоплавающих птиц легко покрывается нефтепродуктами, вследствие чего они теряют способность летать и поддерживать нормальную температуру тела, что, в конечном итоге, приводит к гибели

ли от переохлаждения, голода и интоксикации нефтепродуктами. Помимо острых токсических эффектов нефтяного воздействия, разливы нефти вызывают ряд долговременных демографических последствий, намного более серьезных для популяций птиц, гнездящихся на побережье (Marsili et al., 1969; Trust et al., 2000). Среди водоплавающих птиц чрезвычайно уязвимыми к нефтяному загрязнению оказались гаги вида *Somateria mollissima*. С помощью корреляционного анализа выявлен ряд зависимостей между изменением биохимических показателей (липидов, ферментов лизосом, цитозоля, биотрансформации ксенобиотиков) в печени гаги обыкновенной из региона Белого и Норвежского морей и концентрацией в ней 25 органических поллютантов индустриального происхождения. Аккумуляция ксенобиотиков в печени гаг приводит к увеличению уровня структурных липидов – холестерина и минорных фосфолипидов (ФИ, ФС и СФМ) – посредников разнообразных сигнальных механизмов, запускающих и регулирующих важнейшие метаболические и адаптационные процессы. Установлена высокая степень положительной корреляции между концентрацией целого ряда поллютантов и уровнем насыщенных и моноеновых жирных кислот. У самок гаг самый высокий коэффициент варибельности (CV) по ТАГ установлен в почках (112,9%) и далее, в порядке убывания – мозг (100,7%), печень (70,0%), сердце (61,9%), мышцы (63,7%), гонады (53,1%), внутренний жир (25,6%). Следует отметить высокую варибельность (CV от 109,4% до 191,2%) суммарных фосфолипидов и их отдельных фракций во внутреннем жире. Спектр идентифицированных ЖК во всех изученных тканях гаги практически одинаков, но соотношения между компонентами существенно различаются. Все исследованные органы гаги содержат повышенные количества насыщенных и моноеновых ЖК, что характерно для наземных организмов. Анализ полученных данных выявил индукцию ферментов детоксикации ксенобиотиков, изменение содержания отдельных фракций липидов и жирных кислот в исследованных группах птиц, что является показателем неблагоприятного состояния уток на изученных территориях. Повышение уровня обменных процессов, дополнительные энергозатраты на детоксикационные процессы, также имеющие место в данном случае, судя по активации монооксигеназной системы, могут снизить воспроизводство популяции в целом. У самок по сравнению с самцами во всех исследо-

ванных органах установлен более высокий уровень ТАГ и обнаружена наибольшая разнокачественность. Исследование чувствительности гаги обыкновенной к воздействию нефтеуглеводородов позволяет сделать заключение о высокой, видо-, ткане- и полоспецифичной уязвимости гаги обыкновенной *Somateria mollissima* на биохимическом уровне к воздействию нефтяного загрязнения окружающей среды. Для рыб гаги являются консументами высшего порядка и, таким образом, оценка влияния поллютантов на биохимический статус этих водоплавающих птиц косвенно касается и оценки состояния других водных организмов.

Заключения и выводы

Показана взаимосвязь различных путей клеточного метаболизма в развитии адаптаций у рыб и водных беспозвоночных в ответ на исследованные факторы среды. Ответная реакция организма включает: реализацию защитной функции лизосом, изменения в метаболизме липидов (запасных и мембранных), жирных кислот, холестерина, фосфолипидов и их фракций и их функциональной активности в составе биологических мембран, изменения в белковом метаболизме, проявляющиеся в изменениях активности и соотношении молекулярных форм ферментов внутриклеточного протеолиза и содержания белка, изменение соотношения молекулярных фракций пептидов. Важнейший механизм, связывающий все вышеперечисленные пути обмена – несомненно, энергетический метаболизм; изменения в активности ферментов метаболизма углеводов сказываются на образовании важнейшей энергетической валюты клетки – АТФ. Биохимические адаптации на уровне клеточного метаболизма носят чаще всего компенсаторный характер. Изменяется интенсивность метаболизма и соотношение между отдельными его путями. Следует отметить, что при всей стереотипности наблюдающейся картины в адаптивных реакциях, вызванных разными природными и антропогенными факторами, можно выделить некоторые тонкие различия, определяемые таксономической и половой принадлежностью организма, его физиологическим состоянием, стадией развития, природой и силой воздействующего фактора.

Особенности адаптаций у водных организмов связаны, прежде всего, с полной зависимостью от среды и принадлежностью к группе эктотермных животных, а также с особенностями

цикла развития. Биохимические адаптации у обитателей северных водоемов (стенобионтных организмов, развитие и становление которых происходит при сравнительно низкой температуре, слабой минерализации, олиготрофности) более разнообразны. Для водных организмов характерна некая «растянутость» (во времени) адаптивных перестроек по сравнению с результатами, полученными для теплокровных. Для водных организмов характерен более широкий набор изоферментов, большая степень ненасыщенности жирных кислот, особенности в соотношениях структурных липидов и жирных кислот в мембранах, соответствующие физическим или химическим особенностям среды.

Устойчивость и чувствительность исследованных видов гидробионтов к воздействию различного рода токсических веществ зависит как от степени функционирования ферментов биотрансформации ксенобиотиков, так и от состояния других биохимических систем клетки (лизосомы, мембраны, регуляторные ферменты), участвующих в реализации защитных реакций организма, в развитии ответных реакций клетки на уровне биохимических адаптаций.

Такого рода исследования необходимы для развития теории биохимических адаптаций водных организмов, выработанных в ходе эволюции и имеющих значение для приспособления гидробионтов к изменяющимся факторам, с которыми организм уже встречался ранее и имеет соответствующие адаптации, основанные на количественной и качественной стратегии, а также стратегии микроокружения.

Литература

Амелина В. С. Изменение электрофоретических спектров кислой ДНКазы мидий при различной солености // Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика». Секция «Биологические науки»: междунар. конф., посвящ. 60-летию КарНЦ, окт. 2006 г.: матер. конф. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2006. – С. 36–37.

Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Халаман В. В. Использование биохимических показателей для оценки взаимовлияний животных в сообществах обрастания Белого моря // Материалы X научной конференции Беломорской биологической станции МГУ. – М.: Изд. «Гриф и К», 2006. – С. 18–21.

Амелина В. С., Высоцкая Р. У., Халаман В. В. Исследование взаимовлияния видов в сообществах обрастания Белого моря на биохимическом уровне // Мат. 2-ой научной конференции с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов». – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. – С. 14–15.

Благодарности. Автор статьи признательна сотрудникам лабораторий ИБ КарНЦ РАН А. Е. Веселову, И. Н. Бахмету (лаб. экологии рыб и водных беспозвоночных), Е. П. Иешко, Д. И. Лебедевой (лаб. паразитологии животных и растений), Л. В. Топчиевой (гр. молекулярной биологии), сотрудникам кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ПетрГУ (г. Петрозаводск), В. В. Комову (ИБВВ РАН, п. Борок Ярославской обл.), В. А. Мухину (ПИНРО, г. Мурманск), М. И. Куклиной (ММБИ РАН, г. Мурманск), Н. А. Кашулину (ИППЭС Кольского НЦ РАН, г. Апатиты), сотрудникам Беломорской биологической станции – Халаману В. В., Бергеру В. Я., Сухотину А. В. (ЗИН РАН, г. С.-Петербург), ак. Д. С. Павлову (ИПЭЭ РАН, г. Москва), Г. Г. Серпунину (КГТУ, г. Калининград), Т. Н. Савиной, Сальве Дале, Лионелю Камю (Университет г. Тромсо, Институт Акваплан-Нива, Норвегия).

Работа выполнялась при поддержке гранта Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.04, проектов Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг. и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» 2009–2011 гг., ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», проект 2010-1.1-141-042-010, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» НК-28(12), РФФИ № 08-04-01140а.

Амелина В. С., Высоцкая Р. У. Исследование биохимической реакции беломорских мидий на соленостный стресс и краткосрочную аноксию // Мат. XVI молодежн. науч. конф. «Актуальные проблемы биологии и экологии». Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ УрО РАН, 2009. – С. 24–26.

Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И. Внутриклеточная Ca²⁺-зависимая протеолитическая система животных. – М.: Наука, 2006. 296 с.

Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И., Крупнова М. Ю., Бахмет И. Н. Роль внутриклеточных протеаз в механизмах соленостных адаптаций у представителей различных таксонов биоты Белого моря // Биология Белого моря: X науч. конф. ББС им. Н. А. Перцова, 09–10 авг. 2006 г.: матер. конф. – М.: Изд-во МГУ, 2006. – С. 27–31.

Борковский Н. А. Изменение гидрохимических показателей воды при попадании буровых компонентов // Газовая промышленность. – 1990. – № 6. – С. 30–38.

Васильева О. Б., Лаврова В. В., Иешко Е. П., Немова Н. Н. Влияние паразитарной инвазии на липидный состав печени налима *Lota lota* L. // Материалы 2-ой научной конференции с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. – С. 30.

Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомальные ферменты у рыб. М.: Наука, 2008. 282 с.

Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Амелина В. С., Веселов А. Е., Морозов Д. Н. Активность лизосомальных ферментов у молоди лосося, различающейся выбором участков обитания // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Матер. междунар. конф. (6–9 сентября 2004 г.). Петрозаводск: ИБ КарНЦ РАН, 2004. С. 26.

Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Морозов Д. Н., Ломаева Т. А., Кашулин Н. А. Оценка методами энзимодиагностики резистентности рыб к загрязнению водоема отходами медно-никелевого производства // Материалы междунар. конф., посвященной 100-летию со дня рождения О. И. Семенова-Тянь-Шанского «Современные экологические проблемы Севера» – Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН. 2006. – С. 160–161.

Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Такшеев С. А., Комов В. Т. Биохимические аспекты реакций водных организмов на ртутное загрязнение среды // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы 2-ой научной конференции с участием стран СНГ. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. – С. 37–38.

Высоцкая Р. У., Амелина В. С., Шустова Н. К. Изучение воздействия компонентов буровых растворов на активность ферментов сеголеток семги (*Salmo salar* L.) // Материалы XXVIII междунар. конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» – Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2009. – С. 120–123.

Высоцкая Р. У., Крупнова М. Ю., Кяйвярйянен Е. И., Куклина М. М. Влияние гельминтной инвазии на биохимические показатели птиц Баренцева моря // *Parasites of the Holarctic region*. Petrozavodsk. 2010. V. 1. P. 55–57.

Давыдов В. Г., Микряков В. Р. Адаптивные структуры покровов тела некоторых цестод, связанные с защитой паразитов от влияний организма хозяев. В кн.: «Иммунологические и биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина». – М.: Наука, 1988 – С. 88–100.

Давыдов О. Н. Паразито-хозяйинные отношения при цестодозах рыб – М.: Наука, 1991. – 240 с.

Казаков Р. В., Веселов А. Е. Закономерности смолтификации молоди атлантического лосося. В кн.: «Атлантический лосось» – Л.: Наука, 1998. С. 195–241.

Канцерова Н. П., Лысенко Л. А., Немова Н. Н., Осташкова В. В. Влияние ионов тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы *Mytilus edulis* L. в экспериментах *in vitro* и *in vivo* //

Материалы XXVIII междунар. конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». 5–8 окт. 2009 г., Петрозаводск. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009а. – с. 257–261.

Канцерова Н. П., Лысенко Л. А., Немова Н. Н. Влияние тяжелых металлов на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы беспозвоночных // Материалы XVI Всерос. молодежн. науч. конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» 6–10 апр. 2009 г. Сыктывкар, 2009б. – с. 81–83.

Кириллов П. И., Кириллова Е. А., Павлов Д. С. Некоторые особенности биологии ранней молоди микижи *Parasalmo mykiss* в р. Утхолок (Северо-Западная Камчатка) // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей: VIII междунар. науч. конф., 2007 г.: тез. докл. – Петропавловск-Камчатский: Изд-во Камчатпресс, 2007. – С. 51–55.

Кириллова Е. А. Некоторые особенности биологии молоди кижуча *Oncorhynchus kisutch* первого года жизни в реках Утхолок и Калкавеем (северо-западная Камчатка) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. – Владивосток: Дальнаука, 2008. – Вып. 4. – С. 292–301.

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: сб. ст. – Борок: ИБВВ РАН, 2004. – С. 99–123.

Крупнова М. Ю., Бондарева Л. А., Кашулин Н. А., Немова Н. Н. Активность ферментов внутриклеточного протеолиза у сигов из водоемов региона медно-никелевого производства. // Сборник трудов Межд. конф. «Инновации в науке и образовании» Калининградский технический университет. 2006. Ч. 1. С. 38–40.

Крупнова М. Ю., Немова Н. Н., Кашулин Н. А. Активность ферментов внутриклеточного протеолиза у сигов из водоемов региона медно-никелевого производства // Научный журнал «Известия КГТУ» – 2007. – Т. 11. – С. 32–37.

Кяйвярйянен Е. И., Нефедова З. А., Бондарева Л. А., Веселов А. Е., Павлов Д. С., Немова Н. Н. Кальций-активируемые протеиназы молоди Атлантического лосося при адаптациях к различным местам обитания // Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки: междунар. науч. конф., 25–26 окт. 2007 г.: тез. докл. – Минск – С. 18–19.

Крупнова М. Ю., Немова Н. Н., Серпунин Г. Г. Влияние различных концентраций солености и кислотности среды на активность лизосомальных протеиназ молоди стерляди (*Asipenser ruthenus* L.) // Сборник трудов междунар. конф. «Инновации в науке и образовании – 2008». Калининград: Изд-во КГТУ, 2008. Ч. 1. С. 98–100.

Крупнова М. Ю., Кяйвярйянен Е. И., Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Серпунин Г. Г. Влияние солености и кислотности на активность ферментов осморе-

гуляции и протеолиза молоди стерляди (*Acipenser ruthenus*) // Научный журнал «Известия КГТУ» – 2009. – № 15. – С. 18–23.

Крупнова М. Ю., Немова Н. Н., Комов В. Т. Влияние аккумуляции ртути на активность протеолитических ферментов в жабрах и мышцах окуней из озер, прилегающих к биостанции Картеш. Материалы XXVIII межд. научной конф. «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера». Петрозаводск. 2009. С. 309–312.

Кяйвяряйнен Е. И., Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Серпунин Г. Г., Сементина Е. В., Ударцова Е. А., Величко М. С. Изменение активности фермента осморегуляции Na/K-АТФазы стерляди (*Acipenser ruthenus*) при изменении солености и кислотности. Матер. VI юбилейной Международной научной конференции «Инновации в науке и образовании – 2008», Калининград, 2008. С. 100–101.

Кяйвяряйнен Е. И., Борвинская Е. В., Немова Н. Н., Комов В. Т. Влияние аккумуляции ртути на активность Ca²⁺-активируемых протеиназ в тканях окуней (*Perca fluviatilis*) из озер вблизи биостанции Картеш (Белое море). Материалы XXVIII междунар. конф. Петрозаводск, 5–8 окт. 2009. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009. С. 324–329.

Мосолов В. В. Механизмы контроля протеолиза // Успехи биол. химии. 1988. – Т. 28. – С. 125–144.

Назаренко И. И., Кислова И. В., Кашина Л. И. и др. Атомно-абсорбционное определение ртути в водах после сорбционного концентрирования на полимерном тиоэфире // Журнал аналитической химии. – 1986. – Т. 11. – Вып. 8. – С. 1385–1390.

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. 216 с.

Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И., Бондарева Л. А., Дилбо Т. В., Кашулин Н. А. Внутриклеточный протеолиз у сигов из некоторых озер Мурманской области, загрязненных выбросами ГОКа // Мат. междунар. науч. конф. «Инновации в науке и образовании – 2006», 18–20 окт. 2006 г. – Калининград: Изд-во КГТУ, 2006. – С. 46–48.

Немова Н. Н., Крупнова М. Ю., Бондарева Л. А., Комов В. Т. Активность лизосомальных протеолитических ферментов у окуней (*Perca fluviatilis* L.) с различной концентрацией ртути в мышцах. // Сборник трудов V Международной конференции «Инновации в науке и образовании – 2007», Калининград. Калининград: КГТУ, 2007. – Ч. 1. С. 123–126.

Немова Н. Н. Оценка состояния водных организмов по эколого-биохимическому статусу // «Северные территории России: проблемы и перспективы развития», г. Архангельск, 23–26 июня 2008 г. С. 995–998.

Немова Н. Н., Лысенко Л. А., Канцерова Н. П. Протеиназы семейства кальпаинов. Структура и функции // Онтогенез. – 2010. – Т. 41. – № 5. – С. 1–9.

Мурзина С. А., Нефедова З. А., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Немова Н. Н. Динамика содер-

жания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // Онтогенез. – 2009. – Т. 40. – № 3. – С. 208–214.

Павлов Д. С., Савваитова К. А., Кузицин К. В. и др. Тихоокеанские благородные лососи и форели Азии. М.: Научный мир, 2001. 200 с.

Павлов Д. С., Лупандин А. И., Костин В. В. Механизмы покатной миграции молоди речных рыб. М.: Наука, 2007. 213 с.

Павлов Д. С., Мещерякова О. В., Веселов А. Е., Немова Н. Н., Лупандин А. И. Показатели энергетического обмена у молоди атлантического лосося *Salmo salar*, обитающей в главном русле и притоке реки Варзуга (Кольский полуостров) // Вопросы ихтиологии. – 2007. – Т. 47. – № 6. – С. 819–826.

Павлов Д. С., Немова Н. Н., Кириллов П. И., Кириллова Е. А., Нефедова З. А., Васильева О. Б. Липидный статус и характер питания молоди лососевых в год предшествующий миграции в море, как факторы, определяющие их будущую смолтификацию // Вопросы ихтиологии. – 2007. – Т. 47. – № 3. – С. 241–245.

Павлов Д. С., Кяйвяряйнен Е. И., Нефедова З. А., Бондарева Л. А., Васильева О. Б., Веселов А. Е., Немова Н. Н. Показатели белкового и липидного метаболизма молоди атлантического лосося при адаптациях к различным местам обитания (река Варзуга, Кольский п-ов) // Сборник трудов V Международной конференции «Инновации в науке и образовании – 2007», Калининград. Калининград: КГТУ, 2007. С. 38–39.

Павлов Д. С., Нефедова З. А., Веселов А. Е., Немова Н. Н., Руоколайнен Т. Р., Васильева О. Б., Рипатти П. О. Липидный статус сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* из разных микробиотопов р. Варзуга // Вопросы ихтиологии. – 2008. – Т. 48. – № 5. – С. 679–685.

Павлов Д. С., Савваитова К. А., Кузицин К. В., Груздева М. А., Стенфорд Д. А. Состояние и мониторинг биоразнообразия лососёвых рыб и среды их обитания на Камчатке. М.: Товарищество научных изданий КМК. 2009. 156 с.

Павлов Д. С., Немова Н. Н., Кириллов П. И., Кириллова Е. А., Нефедова З. А., Васильева О. Б. Липидный статус и характер питания двухлеток микижи *Parasalmo mykiss* и кижуча *Oncorhynchus kisutch* в осенний период // Вопросы ихтиологии. – 2010. – Т. 50. – № 4. – С. 561–569

Пронина С. В. Изменение аргирофильной стромы печени некоторых рыб при инвазии плероцеркоидами *Triaenophorus nodulosus* и *Diphyllobothrium dendriticum* // Паразитология. – 1988. – № 11. – С. 361–364.

Рыбина Г. Е. Токсичность буровых шламов разного состава нефтепромыслов Западной Сибири для пресноводных гидробионтов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Борок, 2004. – 21 с.

Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960. 254 с.

- Сидоров В. С., Немова Н. Н., Высоцкая Р. У., Фелков Ю. А. Использование интегрального биохимического индекса при определении предельно допустимых концентраций промышленных токсикантов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – № 3. – С. 345–350.
- Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л., Наука. 1983. 240 с.
- Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Смирнов Л. П., Гурьянова С. Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб: аминокислоты, белки, липиды. Л.: Наука, 1989. 152 с.
- Смирнов Л. П., Богдан В. В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях экотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. М.: Наука, 2007. 182 с.
- Ткач Н. П., Высоцкая Р. У. Сравнительное изучение липидного состава амфипод, обитающих в условиях различной солености // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 10. – С. 89–90.
- Ткач Н. П., Высоцкая Р. У. Влияние нефтяного загрязнения на липидный состав амфипод // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 12. – С. 143–145.
- Ткач Н. П., Высоцкая Р. У., Брызгин В. Ф. Влияние солености среды обитания на жирнокислотный состав общих липидов амфипод Белого моря // Известия Самарского центра Российской академии наук. – 2007. – Т. 1. – С. 98–102.
- Фокина Н. Н. Липидный состав мидий Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. КарНЦ РАН. Петрозаводск. 2010. 242 с.
- Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н., Халаман В. В. Модулирующая роль липидов и их жирных кислот в адаптивной функции мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря при изменении солености // Журнал эволюционной физиологии и биохимии. – 2007. – Т. 43. – С. 379–387.
- Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Модификации спектра запасных липидов у мидий *Mytilus edulis* в ответ на действие различной солености морской воды // Актуальные проблемы биоэкологии: междунар. научно-практич. конф., 21–24 октября 2008 г.: Москва: Изд-во МГОУ, 2008. – С. 67–69.
- Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. Петрозаводск. Изд-во КарНЦ РАН, 2010. 242 с.
- Халаман В. В., Беляева Д. В., Флячинская Л. П. Влияние секреторно-экскреторных продуктов некоторых животных-обработателей на оседание и метаморфоз личинок *Styela rustica* (Ascidiae) // Биология моря. – 2008. – Т. 34. – № 3. – С. 200–204.
- Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Л., 1974. – 230 с.
- Amelina V.S. Enzymatic assay of petroleum products effect on blue mussel *Mytilus edulis* L. // Arctic frontiers. Challenges of oil and gas development in the Arctic: International conference, 25–27 jan. 2008.: abstracts of presentations. – Norway, Tromsø, 2008. – P. 131.
- Bakhmet I.N., Fokina N.N., Nefedova Z.A., Nemova N.N. Physiological-biochemical properties of blue mussel *Mytilus edulis* adaptation to oil contamination // Environ. Monit. Assess. – 2009. – V. 155. – P. 581–591.
- Barrett J. Forty years of helminth biochemistry // Parasitology. – 2009. – V. 136. – № 12. – P. 1633–1642.
- Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signalling // Nature. – 1989. V. 341. – P. 197–205
- Bondareva L.A., Nemova N.N., Kaivarainen E.I. Effect of Heavy Metals on Calcium-dependent Proteases in Fish // Toxicol. Lett. – 2007. – Vol. 172. – S37.
- Borvinskaya E., Smirnov L., Nemova N., Sukhovskaja I. A comparative study of the glutathione S-transferase activity in whitefish (*Coregonus lavaretus*) from basins with different pollution levels. // 4th Intern. scientific conf. BALWOIS 2010, Ohrid, Republic of Macedonia 25–29.05.2010. Электронная публикация. Режим доступа свободный: http://www.balwois.com/balwois/administration/full_paper/ffp-1640.pdf.
- Borvinskaya E.V., Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P. Mercury effect on thiol-containing low molecular weight peptides of rat tissues // 17th International Environmental Bioindicators Conference, Moscow, 2009. P. 15.
- Camus L., Caroll J., Caroll M., Harlaug Olsen G., Nahrgang J., Renaud P., Savinova T., Nemova N., Lee K., Mishin V., Rice S. Arctic frontiers. Challenges of oil and gas development in the Arctic: International conference, 25–27 Jan. 2008: abstract of presentations. – Norway, Tromsø, 2008. – P. 102.
- Chilton F.H. Potential phospholipids source(s) arachidonate used for the synthesis of leukotrienes by the human neutrophils // Biochem. J. – 1989. – V. 258. – P. 327–333.
- Green K.M. Russell B.D., Clark R.J., Jones M.K. [et al.] A sponge allelochemical induces ascidian settlement but inhibits metamorphosis // Marine Biology. – 2002. – V. 140. – P. 355–363.
- Dzik J.M. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization // Acta Biochimica Polonica. – 2006. – Vol. 53. N 1. – P. 33–64.
- Dobretsov S., Dahms H.-U., Qian P.Y. Antilarval and antimicrobial activity of waterborne metabolites of the sponge *Callyspongia* (Euplaccella) *pulvinata*: evidence of allelopathy // Marine Ecology Progress Series. – 2004. – V. 271. – P. 133–146.
- Marsili L., Fossi S., Casini S., Focardi. PCB levels in bird blood and relationship to MFO responses // Chemosphere. – 1996. – V. 33. – N. 4. – P. 699–710.
- Michell R.H. Activation hydrolyse of phosphoinositids and Ca-channels // Biochem. Biophys. Acta. – 1975. – V. 415. – P. 81–147
- Kantserova N.P., Lysenko L.A., Nemova N.N. Effect of Waterborne Copper and Cadmium on Calcium-dependent Proteases in Blue Mussel, *Mytilus edulis* L. // 4th Intern. scientific conf. BALWOIS 2010, Ohrid, Republic of Macedonia 25–29.05.2010. Электронная публикация. Режим доступа свободный: http://www.balwois.com/balwois/administration/full_paper/ffp-1539.pdf.

Nemova N.N., Bondareva L.A. Problem of Proteolytic Enzyme Evolution // *Biochemistry. Suppl. Series B: Biomedical Chemistry*. 2008. Vol. 2. P. 115–125.

Nemova N.N. Biochemical markers of pollution effect in the fish from water ecosystems of Karelia (Russia) // *Toxicol. Lett.* – 2007. – Vol. 172. – S. 176.

Oil spill. Response challenges in Arctic Waters / WWF Report. – Oslo: WWF International Arctic Programme, 2007. – 32 p.

Rittenhouse-Simons S. Indomethacin-induced accumulation of diglyceride in activated human platelets // *J. Biol. Chem.* – 1980. – V. 255. – P. 2259–2262.

Sajid M., McKerrow J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2002. – Vol. 120. – P. 1–21.

Thomas J.D. The ecology of fish parasites with particular reference to helminth parasites and their salmonid fish hosts in Welsh rivers: a review of some of the central questions // *Adv. Parasitol.* – 2002. – V. 52. – № 1. – P. 1–154.

Trust K.A., Esler D., Woodin B.R., Stegeman J.J. Cytochrome P450 1A Induction in Sea Ducks Inhabiting Nearshore Areas of Prince William Sound, Alaska // *Marine Pollution Bulletin.* – 2000 (b). – V. 40. – N. 5. – P. 397–403.

Fokina N.N., Nefedova Z.A., Ruokolainen T.R., Nemova N.N. The role of lipids in the acclimation to salinity in euryhaline mussels *Mytilus edulis* L. in the White Sea // *Chemistry and physics of lipids. Abstracts from 47th International Conference on the Bioscience of Lipids*. 5–10 Sept. 2006: Abstracts. – Pecs, Hungary: Elsevier, 2006. – V. 143. – P. 85.

MECHANISMS OF BIOCHEMICAL ADAPTATIONS IN WATER ORGANISMS: ECOLOGICAL AND EVOLUTIONAL ASPECTS

N.N. Nemova

Institute of Biology, Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia
e-mail: nemova@krc.karelia.ru

The interrelation of various ways of a cellular metabolism in development of adaptations in fishes and water invertebrates as a response to the investigated environmental factors is shown. Response reactions of an organism includes: realization of protective function of lysosomes, changes in a metabolism of lipids (reserve and membrane), fatty acids, cholesterol, phospholipids and their fractions as well as their functional activity in biological membranes, changes in the protein metabolism due to activity variation and composition of molecular forms of intracellular proteases, tissue protein content, changes in molecular composition in peptide fraction. The major mechanism binding all metabolic pathways – it is doubtless, energy metabolism; changes in activity of carbohydrate metabolism enzymes affect production of the major power currency of a cell – ATP. Biochemical adaptations at a level of a cellular metabolism more often trend to compensate the effect of natural and anthropogenic factors through changes in metabolism intensity and ratio between separate metabolic pathways.

Peculiarities in adaptations of water organisms are associated, first of all, to full dependence on environment as a group of ectothermal animals, as

well as with developmental cycle features. Biochemical adaptations in northern water inhabitants (stenobionte species with development at low temperature, weak mineralization, and oligotrophy) are more various. It was shown certain delay in adaptive reorganizations in water organisms in comparison with warm-blooded species. There are wider isoenzyme composition, high level of unsaturated fatty acids, features in ratio of structural lipids and fatty acid composition of membrane structures in water organisms, which are corresponding to physical and chemical features of surrounding environment.

Resistance or sensitivity of the investigated species at the effect of various toxic substances depends both on a degree of functional activity of xenobiotic biotransformation enzymes, and on other biochemical cell system activity (lysosomes, membranes, regulatory enzymes) realizing some protective reactions of an organism.

Investigations of this nature are necessary for development of the theory organism's biochemical adaptations evolved and developed in evolution of life and based on quantitative and qualitative strategy, as well as strategy of the microenvironment.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ РАЗНЫХ ПОРЦИЙ ТЕКУЧЕЙ ИКРЫ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L.

З. А. Нефедова, С. А. Мурзина, Т. Р. Руоколайнен, П. О. Рипатти, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: imagination@onego.ru

Одним из основных биохимических критериев зрелости икры и готовности ее к оплодотворению является содержание в ней липидов, а уровень и соотношение отдельных липидных фракций являются показателями жизнеспособности потомства (Крыжановский, 1960; Tocher, 2003). К началу нереста в яйцах лосося накапливается большой запас структурных и энергетических липидов, которые должны обеспечивать нормальное развитие зародыша и выживание личинок после выклева.

Проведена сравнительная оценка липидных спектров отдельных субпорций текучей икры из разных частей яичника – задней хвостовой (1), средней (2) и головной (3) у пресноводного лосося *Salmo salar*.

Методами тонкослойной, высокоэффективной жидкостной и газожидкостной хроматографии определяли концентрацию общих липидов, в том числе триацилглицеринов (ТАГ), холестерина (ХС), эфиров холестерина (ЭХС), фосфолипидов (ФЛ) и их отдельных фракций: фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), а также жирных кислот (ЖК) общих липидов в разных порциях текучей икры лосося, индивидуально у каждой самки.

Образцы фиксировали 97% этиловым спиртом с добавлением 0,001% антиоксиданта ионола и тщательно измельчали, заливали смесью хлороформ–метанол (2 : 1) и хранили до анализа на холоде (+4 °С). Липиды экстрагировали по методу Фолча (Folch et al., 1957). Общие липиды разделяли на фракции (ФЛ, ТАГ, ХС, ЭХС) на тонкослойных хроматографических пластинках «Silufol» («Kavalier», Чехия) в смеси растворителей петролейный эфир–серный эфир–уксусная кислота (90:10:1). Количество ФЛ, ТАГ и ЭХС определяли гидроксаматным методом (Сидоров и др., 1972), холестерина – по реакции с окрашивающим реагентом (Engelbrecht et al.,

1974) и выражали в процентах от веса сухого вещества пробы.

Состав индивидуальных фосфолипидов (ФХ, ФЭА, ФС) анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на стальной колонке Nucleosil 100-7 («Элсико», Москва), используя элюент ацетонитрил–гексан–метанол–ортофосфорная кислота (918:30:30:17.5). Детектирование проводили по степени поглощения света при 206 нм (Arduini et al., 1996). Соотношение между компонентами оценивали по величинам площадей пиков на хроматограмме.

Содержание жирных кислот общих липидов в виде метиловых эфиров определяли методом газожидкостной хроматографии (Новак, 1978). Разделение проводили на хроматографах «Кристалл 5000» («Хроматек», Йошкар-Ола) с пламенно-ионизационным детектором в капиллярной колонке ZB-FFAP длиной 50 м (внутренний диаметр 0,32 мм, толщина слоя жидкой фазы 0,50 мкм).

Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия различий U – Уилкоксона-Манна-Уитни (Гублер, Генкин, 1969).

Установили, что уровень общих липидов в хвостовой (1) и средней (2) порциях текучей икры лосося практически одинаков и составлял 21,9% и 21,4% сухой массы, соответственно, а в головной (3) порции икры был несколько выше – 23,4% сухой массы за счет повышенного содержания структурных ФЛ (11,0% сухой массы) (рис. 1).

При этом доля ФЛ в хвостовой и средней порциях икры составляла 9,1% и 9,5% сухой массы, соответственно (рис. 1). Повышенный уровень ФЛ в головной порции текучей икры обусловлен большей долей в них ФХ, ФЭА, ФС по сравнению с таковыми в первых двух порциях икры (рис. 2). ФХ наряду с ФЭА составляет основную массу фосфолипидов не только в яйцах лосося, но и у других видов рыб (Cowey et al, 1985; Нефедова и др., 1994).

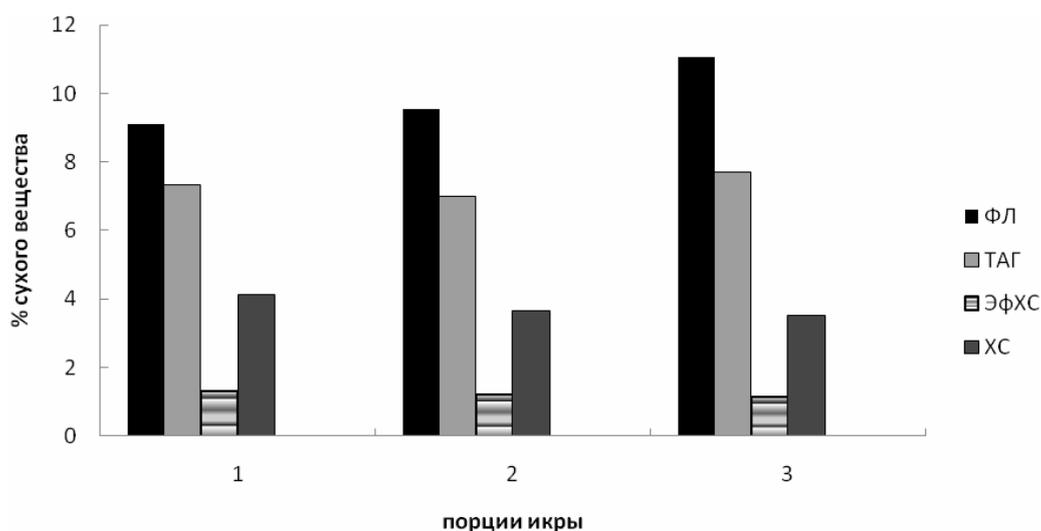


Рис. 1. Липидный состав (фосфолипиды (ФЛ), триацилглицерины (ТАГ), эфиры холестерина (ЭФХЛ), холестерин (ХЛ)) порций текучей икры пресноводного лосося *Salmo salar* L. (% сухого вещества).

Примечание: по оси абсцисс – порции икры: 1 – хвостовая, 2 – средняя, 3 – головная; по оси ординат – % сухого вещества.

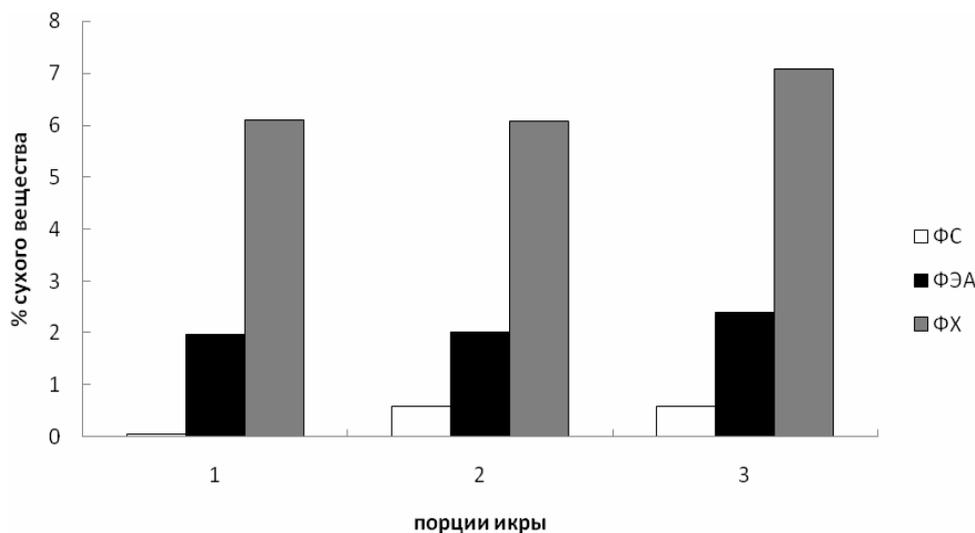


Рис. 2. Состав отдельных фосфолипидов (Фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтанолламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ)) порций текучей икры пресноводного лосося *Salmo salar* L. (% сухого вещества).

Примечание: по оси абсцисс – порции икры: 1 – хвостовая, 2 – средняя, 3 – головная; по оси ординат – % сухого вещества.

Известно, что значительное количество ФХ связано со специфическим белком яиц – липовителлином, который под действием половых гормонов синтезируется в печени рыб, транспортируется кровью в ооциты и откладывается в желтке. В небольших количествах этот белок синтезируется в самих ооцитах (Айзенштадт, 1977). Липовителлин является основным резервным веществом яиц рыб, обеспечивающим энергетическими и структурными компонентами развивающиеся эмбрионы, а также личинки после выклева до перехода их на внешнее питание. Показано, что близкие по своей химической природе глицерофосфо-

липиды ФХ, ФЭА и ФС метаболически связаны, и между ними возможны различные взаимопревращения. Так, при распаде ФХ специфический компонент холин служит одним из источников лабильных метильных групп, участвующих в синтезе фосфолипидов, что важно для развивающегося зародыша лосося с длительным эмбриональным периодом развития. Кроме того, ФХ может быть использован в процессе эмбриогенеза и как энергетическое вещество (Cowey et al., 1985; Sejas et al., 2004). ФХ, ФЭА и ФС являются структурными компонентами биомембран и специфическими активаторами ряда мембраносвязанных ферментов

животных организмов (Тюрин и др., 1996; Коломийцева и др., 2003). В головной порции (3) текучей икры лосося содержание запасных ТАГ (рис. 1), а также показатель ФЛ/ТАГ были выше по сравнению с таковыми двух предыдущих порций (1 и 2) (рис. 3). При этом, хвостовая порция икры отличалась повышенным уровнем структурных липидов – ХС и его запасной формы ЭХС, а также показателем ХС/ФЛ (рис. 3).

Анализ жирнокислотного состава общих липидов отдельных субпорций текучей икры лосо-

ся показал значительную долю в них ПНЖК (от 47,6% до 51,2% суммы ЖК), основными из которых были докозагексаеновая 22:6(n-3) (от 12,65% до 14,1% суммы ЖК) и эйкозапентаеновая 20:5(n-3) (от 7,7 до 8,4% суммы ЖК) (табл.). В яйцеклетках головной части (3) гонад по сравнению с другими субпорциями выявлен наибольший уровень данных ПНЖК, а также 20:4(n-6) и пониженная доля насыщенных (14:0, 16:0 и 18:0) и моноеновых (18:1(n-9) и 16:1(n-7)) ЖК (табл.).

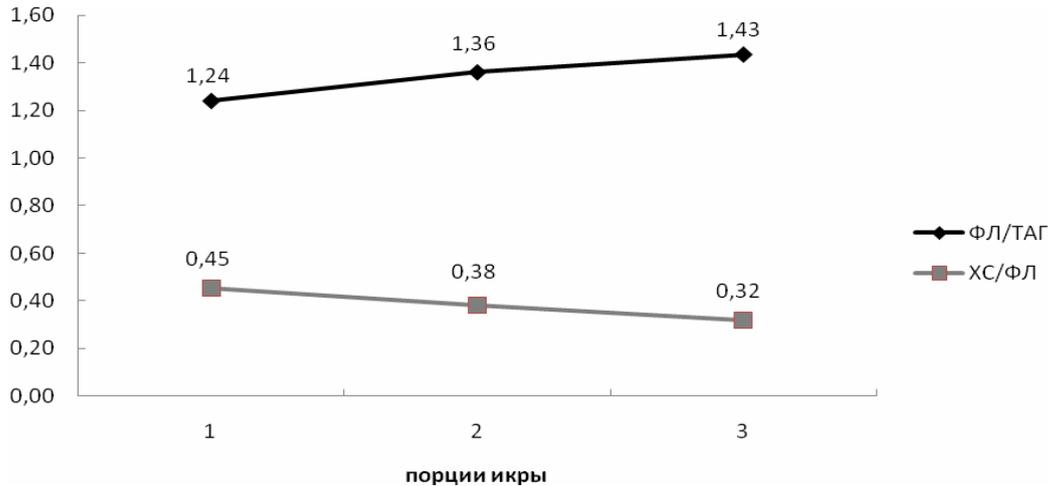


Рис. 3. Показатель ФЛ/ТАГ и ХС/ФЛ порций текучей икры пресноводного лосося *Salmo salar* L.

Примечание: по оси абсцисс – порции икры: 1 – хвостовая, 2 – средняя, 3 – головная.

Жирнокислотный состав порций текучей икры пресноводного лосося *Salmo salar* L. (% суммы ЖК)

Порции икры/ЖК	14:00	16:00	18:00	16:1(n-7)	18:1(n-9)	20:4(n-6)	20:5(n-3)	22:6(n-3)
1	1,43	12,95	6,16	7,57	15,92	5,89	7,84	12,87
2	1,4	12,97	6,14	7,21	15,94	5,84	7,74	12,65
3	1,07	11,89	6,09	6,75	15,17	6,16	8,39	14,06

Итак, данное исследование разных субпорций текучей икры (хвостовой-1, средней-2 и головной-3) у одних и тех же самок лосося показало в головной (3) порции более высокий уровень общих липидов, за счет структурных ФЛ (фракции ФХ, ФЭА, ФС), запасных ТАГ, показателя ФЛ/ТАГ, 20:5(n-3), 22:6(n-3) и 20:4(n-6) ПНЖК, но пониженную долю ХС, его запасной формы ЭХС и показателя ХС/ФЛ.

Исследования липидного спектра гонад самок бестера (гибрид белуги и стерляди) выявили прямую зависимость оплодотворяемости икры от уровня ФЛ, показателей ФЛ/ТАГ и ХС/ФЛ. (Абросимова и др., 1999). Более высокая оплодотворяемость отмечена для икры с повышенным содержанием ФЛ, ПНЖК (n-3) семейства, показателями ФЛ/ТАГ, (n-3)/(n-6) и низким уровнем ПНЖК (n-6) семейства и показателя ХС/ФЛ. Ав-

торы заключают, что обнаруженные различия в липидном спектре могут быть причиной незавершенных процессов созревания икры в определенных участках гонад одной самки.

Разновременность созревания икры из разных частей яичника у одних и тех же самок осетровых рыб не только бесспорно установлена, но и приобрела практическое значение в осетроводстве (Жукинский, 1981). Опыт разведения дальневосточных растительноядных рыб – белого амура и белого толстолобика показал, что икра хорошего качества бывает только в первой (хвостовой) и второй (средней) субпорциях (Вовк, 1976). Асинхронность созревания икры в яичниках одних и тех же самок установлена и для других видов рыб: сельдевых, карповых, окуневых, кефалевых, камбаловых и лососевых (кета, горбуша, радужная форель и т.д.) (Жукинский, 1981).

Выявленная разнокачественность по липидному статусу отдельных порций текущей икры лосося *Salmo salar* свидетельствует об асинхронности процессов ее созревания в разных частях гонад, что может отразиться на способности оплодотворяться, росте и развитии зародыша, а также дальнейшей дифференциации молоди.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-01140-а, РФФИ 08-04-01691-а, Программы Президента РФ «Ведущие научные школы НШ- 3731.2010.4.

Литература

Абросимова Н. А., Бирюкова А. А., Марадуда А. Ю. 1999. Зависимость оплодотворяемости икры бестера от ее биохимического состава // Тез. докл. 1-й научно-практич. конф. «Проблемы соврем. товарного осетроводства». Астрахань. 24 марта 1999. С. 102–103.

Айзенштадт Т. Б. 1977. Рост ооцитов и вителлогенез // Современные проблемы оогенеза. М. С. 5–15.

Вовк П. С. 1976. Биология дальневосточных растительноядных рыб и их хозяйственное использование в водоемах Украины. Киев: Наук. думка. 248 с.

Жукинский В. Н. 1981. Субпорционность созревания, перезревания и выметывания икры у рыб в связи с исследованием ее разнокачественности. // Разнокачественность онтогенеза у рыб. Киев: Наук. думка. С. 7–36.

Коломийцева И. К., Перепелкина Н. И., Патрушев И. В., Попов В. И. 2003. Роль липидов в сборке эндоплазматического ретикулума и диктиосом нейрональных клеток коры головного мозга якутского суслика *Citellus undulates* при гибернации // Биохимия. Т. 68. Вып. 7. С. 954–967.

Крыжановский С. Г. 1960. О значении жировых отложений в яйцах рыб. // Зоол. журн. Т. 39. С. 111–123.

Нефедова З. А., Сидоров В. С., Юровицкий Ю. Г. 1994. Липидный состав зрелых яиц костистых рыб // Онтогенез. Т. 25. С. 53–59.

Новак И., 1978. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир. 180 с.

Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. 1972. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тка-

невая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. // Лососевые (*Salmonidae*) Карелии. Петрозаводск: Карел. Фил. АН СССР. Вып. 1. С. 152–163.

Тюрин В. А., Ардуини Ю. Ю. 1996. Репарация липидного бислоя мембран при окислительном стрессе: реакцирование фосфатидилэтаноламина в мембранах синапсом, фоторецепторов и эритроцитов // Журн. эволюц. биохим. физиол. Т. 32. № 3. С. 248–255.

Arduini A., Peschechera A., Dottoris S. et al. 1996. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // J. Lipid Res. V. 37. P. 684–689.

Cejas J. R. 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. V. 139. P. 209–216.

Cowey C.B., Bell J.G., Knox D. et al. 1985. Lipids and lipid antioxidant systems in developing eggs of salmon (*Salmo salar*) // Lipids. V. 20. № 9. P. 567–572.

Engelbrecht F.M., Mari F., Anderson J.T. 1974. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method // S.A. Med. J. V. 48. № 7. P. 250–356.

Folch J., Lees M., Sloan-Syanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle). // J. Biol. Chem. V. 226. P. 497–509.

Tocher D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // Reviews in fisheries science. V. 11(2). P. 107–184.

LIPID SPECTRUM OF DIFFERENT UNFERTILIZED EGG PORTIONS OF *SALMO SALAR* L.

Z.A. Nefedova, S.A. Murzina, T.R. Ruokolainen, P.O. Ripatti, N.N. Nemova

Institute of biology, Karelian Research Centre RAS, Russia, Petrozavodsk
e-mail: imagination@onego.ru

The comparative study of total lipid spectrum and individual phospholipids in three portions of unfertilized eggs from individual females of *Salmo salar* L. during spawning was made using TLC and HPLC methods. The significant differences in amount of total lipids and levels of neutral and polar lipid classes in portions of unfertilized eggs were determined which might show lipid spectrum

distinction of early, middle and late portions of spawn eggs. The established lipid spectrum of eggs might affect on a life strategy and survival rate of larvae *Salmo salar* L. in nature. We discussed importance of results in light of contemporary view on biochemical supposition in formation of different phenotype groups of *Salmo salar* L. larvae.

РОЛЬ НЕЙРОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССАХ РАЗВИТИЯ СТРЕКАЮЩИХ *AURELIA AURITA* (SCYPHOZOA) И *GONOTHYRAEA LOVENI* (HYDROZOA) И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НА СТАДИЯХ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА

Т. Д. Орлова, И. А. Косевич

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия
e-mail: planyla@gmail.com, ikos@mail.ru

Введение

Большинство представителей Cnidaria, относящиеся к классам Scyphozoa и Hydrozoa, имеют сложный жизненный цикл с чередующимися жизненными формами: медузоидной и полипоидной, которые характеризуются половым и бесполом размножением, соответственно (Fautin, 1999). Период раннего онтогенеза включает эмбриогенез, существование личиночной формы и стадии метаморфоза личинки.

Для Cnidaria характерно наружное или наружно-внутреннее оплодотворение, которое происходит в гастральной полости или в гонофорах (Fautin, 1999). Дробление зиготы вариабельно, но в результате формируется полая целобластула или цельная стереобластула. Способы гастрულიации также варьируют: это может быть инвагинация, уни- и мультиполярные ингрессия, деламинация или эпиболия. Во время гастрულიации запускаются процессы клеточной дифференцировки. Постепенно происходит превращение эмбриона в свободно плавающую личиночную стадию – планулу (Yuan et al., 2008). При этом эмбрион вытягивается вдоль антерио-постериорной оси, поэтому ранние стадии округлые, более поздние – удлинённые. Стадия планулы начинается тогда, когда организм может однопавлено передвигаться (Yuan et al., 2008).

Планула равномерно покрыта ресничками и имеет цилиндрическую форму. Перед началом метаморфоза планула принимает булавовидную форму и плавает расширенным концом вперед (Martin and Chla, 1982; Martin et al., 1983). Личинка оседает на подходящий субстрат передним расширенным концом и претерпевает метаморфоз. При этом она укорачивается и приобретает округлую форму. Затем животное вновь начинает удлиняться. Оральная часть поднимается

над субстратом и трансформируется в первичного полипа. Аборальная часть остаётся прикреплённой к субстрату и формирует подошву полипа. Так дифференцируется первичный полип и начинается полипоидная фаза жизненного цикла (Martin et al., 1983).

Особенный интерес представляет тот факт, что каждая стадия развития характеризуется своим специфическим пространственным паттерном клеток с нейроактивными веществами. При переходе к последующей стадии нейрональная система предыдущей стадии часто полностью утрачивается.

К настоящему времени информации о распределении и функциях нейроактивных веществ в эмбриональных клетках сцифоидных и гидроидных накоплено очень мало. Однако есть данные, полученные на эмбрионах других беспозвоночных. Считается, что холинэргические, адренэргические и серотонинэргические системы представлены на ранних эмбриональных стадиях всех позвоночных и беспозвоночных животных. У морского ёжа и дрозофилы антагонисты серотонина блокируют первое деление дробления и морфогенетические движения клеток во время гастрულიации. У ранних эмбрионов *Tritonia diomedea* (Mollusca, Nudibranchia) начиная с зиготы и до 8-клеточной стадии серотонин обнаруживается в области цитоплазмы, близкой к анимальному полюсу. На стадиях морулы и бластулы метка к серотонину проявляется в группе микромеров на анимальном полюсе (Buznikov and Shmukler, 1981; Buznikov et al., 2003).

Нейрональная организация личинок стрекающих изучено намного подробнее. У личинок Cnidaria нейроактивные вещества концентрируются в клетках эктодермы антериорного полюса тела (Nakanishi et al., 2008). Личинка *Aurelia aurita*, как и большинство планул других стрека-

ющих, имеет эктодермальную нервную систему, состоящую из нескольких типов нейронов. Это «апикальные нейроны» – клетки в апикальном органе, расположенном на anteriорном полюсе тела личинки; «латеральные нейроны» – клетки, расположенные с интервалом через 3–5 клеток в боковой эктодерме и содержащие нейроактивные вещества. Аксоны нейронов апикального органа образуют сплетение в основании апикального органа и тянутся вдоль мезоглеи к постериорному (оральному) концу личинки (Nakanishi et al., 2008). Нейроны и их аксоны содержат различные нейроактивные вещества, такие как LW-, RF- и FMRF-амиды, серотонин, таурин, дофамин, γ -аминомасляную кислоту, тирозинированный тубулин и пр. (Katsukura et al., 2004; Kass-Simon and Pierobon, 2007; Nakanishi et al., 2008).

Апикальный орган играет важную роль в процессе оседания планулы. Возможно, сенсорные клетки апикального органа несут на внешней мембране химические структуры, необходимые для инициации прикрепления и/или метаморфоза (Yuan et al., 2008). Интересно, что при введении в среду экзогенных веществ из числа перечисленных выше, поведение личинок изменяется. На планулах *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) было показано, что внесение в среду LW-амида ускоряет движения личинок в поисках субстрата для оседания. Добавление RF-амида делает движения планул более медленными и непродолжительными. В высоких концентрациях LW-амид стимулирует, а RF-амид ингибирует метаморфоз планул указанного вида (Katsukura et al., 2004). Внесение серотонина стимулирует метаморфоз у планул гидроидных *Eudendrium racemosum* и *Phialidium gregarium* (Zega et al., 2007).

В ходе оседания и метаморфоза происходят морфологические изменения клеток и всего тела планулы. Судьба личиночных клеток варьирует: некоторые дегенерируют и не восстанавливаются, другие могут оставаться неизменными на взрослой стадии, и, наконец, некоторые могут подвергаться морфологическим изменениям при дальнейшем развитии. Предполагается, что сенсорные клетки воспринимают сигналы, инициирующие прикрепление и метаморфоз, и через нервное сплетение передают эту информацию другим клеткам планулы. Как только включается триггер метаморфоза в соседних клетках, сенсорные клетки дегенерируют (Martin et al., 1983). Это подтверждают иммуногистохимические исследования, проведенные при помощи антител к FMRF-амиду на *A. aurita*. В процессе превращения в полип экспрессия FMRF-амида в

эктодерме планулы понижается, переходит в эндодерму и там исчезает, что, скорее всего, связано с апоптозом FMRF-амид-содержащих клеток. Антериорный (аборальный) тип концентрации эктодермальных нейронов, свойственный планулам, полностью дегенерирует и «вторичная» нервная система, в которой нейроны располагается на постериорном (оральном) конце полипа, развивается *de novo*. Это свойственно и гидроидным (Nakanishi et al., 2008).

Целью настоящей работы было выявить распределение клеток, содержащих различные нейроактивные вещества, на стадиях раннего онтогенеза *Aurelia aurita* и *Gonothyraea loveni*.

Материалы и методы

Объектами исследования были выбраны эмбрионы, планулы и первичные полипы *Aurelia aurita* и *Gonothyraea loveni*.

Материал по *A. aurita* был собран в августе 2008–2009 годов на Беломорской биостанции им. Н. А. Перцова МГУ им. М. В. Ломоносова. Из моря вылавливали самок медуз *A. aurita* и извлекали из карманов ротовых лопастей эмбрионы и планулы. Далее за их развитием наблюдали в лаборатории при 18 °С.

Эмбрионы и планулы *G. loveni* были собраны в июне-июле 2009 года на ББС МГУ. Их извлекали из медузоидов женских колоний и содержали при 18 °С для изучения дальнейшего развития.

Животных на разных стадиях развития фиксировали 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (рН 7,4).

Для выявления серотонина, FMRF-амида и тубулина использовали метод иммуноцитохимии как наиболее удобный и отвечающий требованиям поставленной цели. Окраску антителами проводили согласно стандартному протоколу. Визуализацию результатов осуществляли при помощи лазерного конфокального микроскопа Leica TCS SPE с объективами x10, x40 и x63.

Результаты и обсуждение

Иммуноцитохимическое исследование эмбрионов *A. aurita* и *G. loveni* на наличие серотонина показало, что нейротрансмиттер содержится почти во всех бластомерах дробящихся эмбрионов обоих видов (рис. 1). Интересно, что в данном случае наблюдается крупно-гранулярное окрашивание, что может говорить в пользу содержания серотонина в желточных гранулах, которыми наполнены клетки эмбрионов. Это

предположение соответствует данным, полученным на дробящихся эмбрионах многощетинкового червя *Ophryotrocha labronica*. Так, на *O. labronica* автораддиографическим методом было показано, что синтез и накопление серотонина происходит именно в желточных гранулах. Возможно, серотонин постепенно выделяется из желточных гранул и взаимодействует с микрофиламентами. Таким образом контролируется сократительная активность клеток эмбриона и деления дробления (Emanuelsson, 1974). Локализация вновь синтезированного серотонина во внутриклеточных желточных гранулах показывает, что это продукт активности материнских генов (Emanuelsson et al., 1988).

FMRF-амид не был выявлен нами в дробящихся эмбрионах *A. aurita* и *G. loveni*.

У планул *A. aurita* и *G. loveni* метки к серотонину включаются в клетки апикального органа, а также отдельные эктодермальные клетки (рис. 2). Присутствие серотонина в апикальном органе планул было также показано у гидроидных *Phialidium gregarium* (McCauley, 1997), *Hydractinia echinata*, *Eudendrium racemosum* (Zega et al., 2007). На снимках видно, что окрашивание имеет мелко-гранулярную структуру. Это может свидетельствовать о том, что серотонин содержится внутри везикул, характерных для нервных клеток стрекающих (Grimmelikhuijzen et al., 2002).

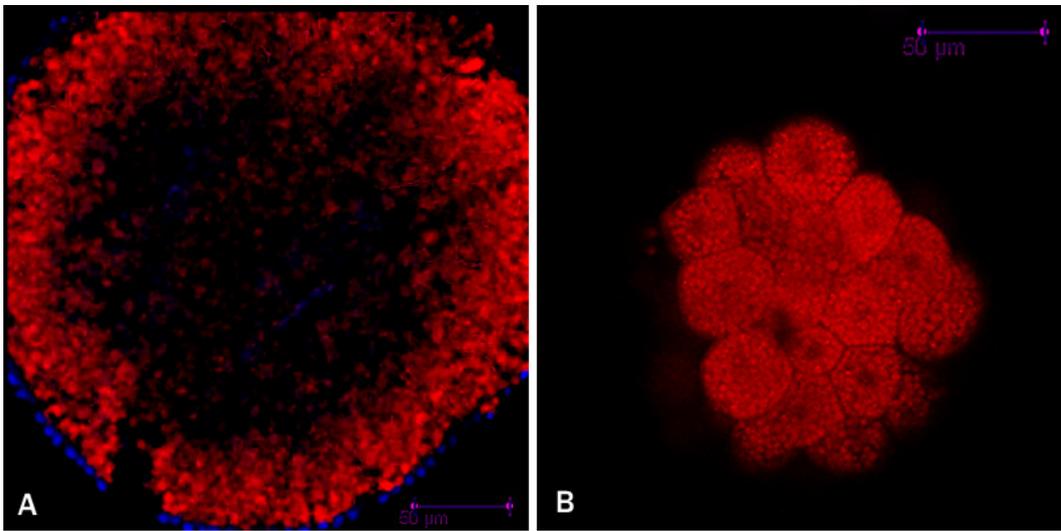


Рис. 1. Распределение серотонина (красный цвет) на эмбриональных стадиях *A. aurita* (А) и *G. loveni* (В). Синим цветом окрашены ядра

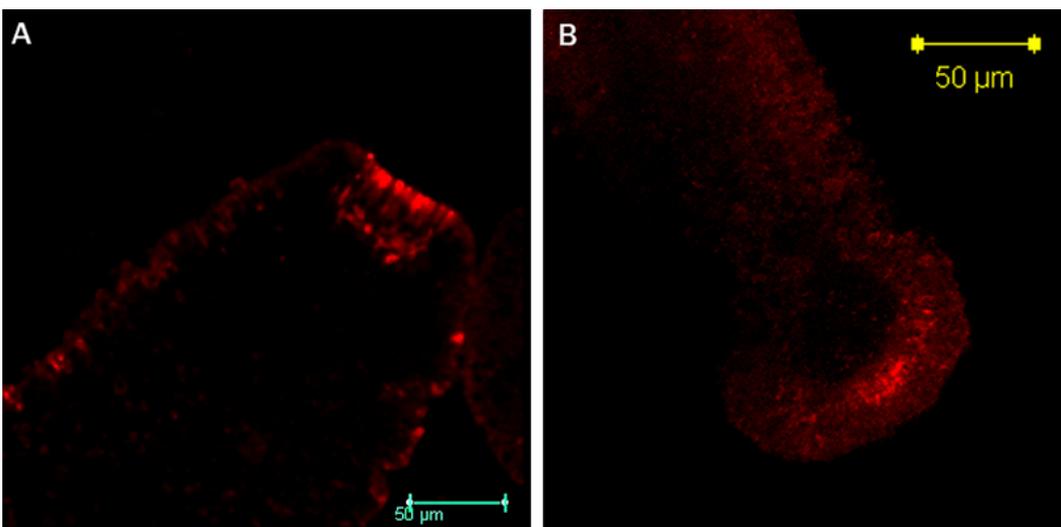


Рис. 2. Антериорные полюса зрелых планул *A. aurita* (А) и *G. loveni* (В). Окрашивание антителами против серотонина (красный цвет)

Стоит отметить, что иммуноцитохимически методами серотонин выявляется уже у молодых планул (препланул) *A.aurita* (рис. 3), в то время как у *G.loveni* положительная реакция наблюдается только у планул, компетентных к метаморфозу: до этого момента серотонин в клетках личинок *G.loveni* не обнаруживается. Это может указывать на более узкий спектр процессов, происходящих у *G.loveni* с участием серотонина, и касающихся только инициации метаморфоза. У *A.aurita* серотонин, скорее всего, связан также с другими функциями в организме, что может объяснить его регистрацию в клетках апикального органа препланул. Возможно также, что у *A.aurita* синтез серотонина, необходимого в момент инициации метаморфоза, начинается раньше, уже у молодой планулы. А у *G.loveni* синтез начинается непосредственно перед началом периода компетентности к метаморфозу. Этот факт подчеркивает различный вклад серотонина в процесс метаморфоза у представителей двух разных групп стрекающих.

Пространственно-временные паттерны FMRF-амида, напротив, схожи у *A.aurita* и *G.loveni*. Этот нейропептид выявлен в виде мелко-гранулярного окрашивания в апикальной цитоплазме клеток апикального органа (рис. 4). Апикальный орган, как сенсорная структура

планул, отвечает за восприятие внешних химических сигналов, в том числе инициирующих процессы метаморфоза (Nakanishi et al., 2008). Следовательно, FMRF-амид, как и серотонин, может опосредовать проведение подобных сигналов, обеспечивая межклеточную передачу информации.

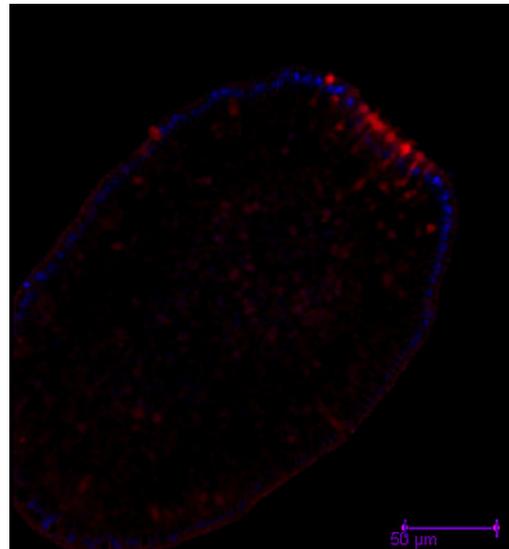


Рис. 3. Препланула *A.aurita*. Иммуноцитохимическое окрашивание антителами против серотонина (красный цвет). Синим цветом окрашены ядра

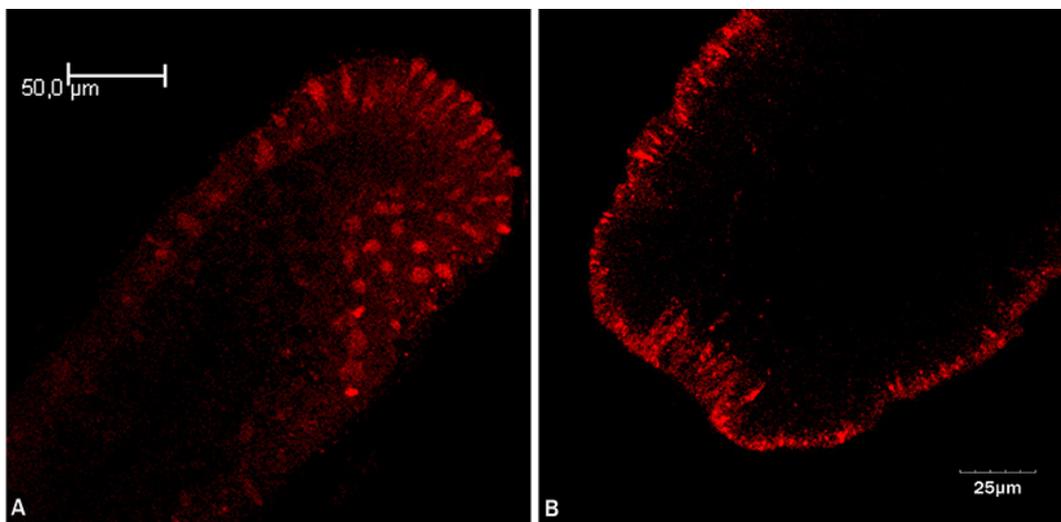


Рис. 4. Антериорные полюса зрелых планул *G.loveni* (А) и *A.aurita* (В), иммуноцитохимическое окрашивание на FMRF-амид (красный цвет)

Ранее при исследованиях планул *A.aurita* было выявлено иммунологическое включение метки к FMRF-амиду в область апикального органа (Nakanishi et al., 2008). Для *G.loveni* изучение паттерна нейроактивных веществ было проведено впервые, также впервые установлено наличие

серотонина у *A.aurita*. Однако в отличие от проведенных ранее исследований нами не были выявлены отростки нервных клеток – аксоны, – содержащие серотонин или FMRF-амид. Подобные структуры в области мезоглеи наблюдались лишь у *G.loveni* при использовании антител про-

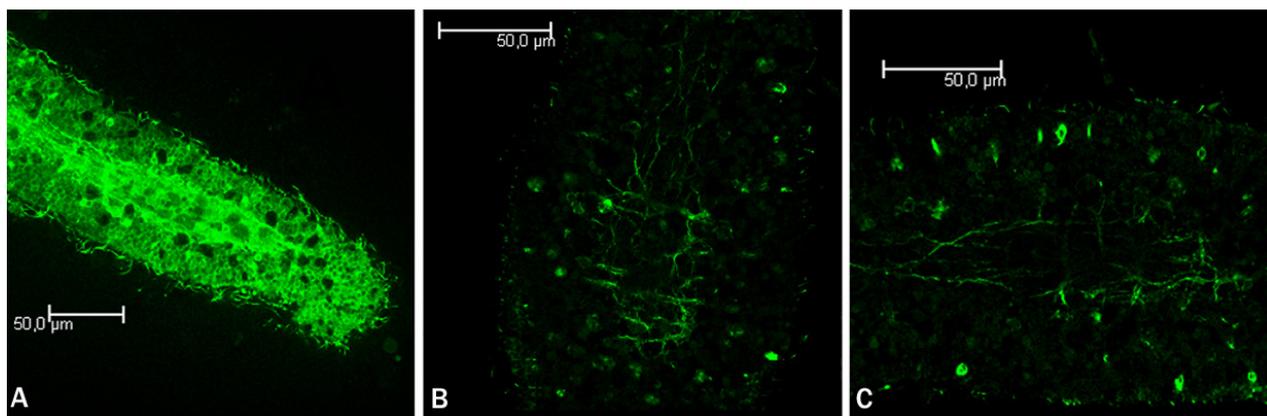


Рис. 5. Окрашивание антителами против тирозинированного тубулина (зеленый цвет) зрелых планул *G.loveni*. А – anteriорная половина тела; В, С – средняя часть тела, два оптических среза на разном расстоянии от поверхности

тив тирозинированного тубулина (рис. 5), который предположительно является нейральным маркером (Gröger and Schmid, 2001; Voronezhskaya et al., 2002). Клетки, дающее положительное окрашивание на тирозинированный тубулин, к настоящему моменту мало изучены, однако, есть данные, согласно которым некоторые из этих клеток содержат также и серотонин. При этом нейросенсорную функцию приписывают именно клеткам с колокализацией серотонина и тирозинированного тубулина (Zega et al, 2007). У гидроидного *Podocoryne carnea* тирозинированный тубулин появляется в клетках позже других нейроактивных веществ. Сначала аксоны, содержащие тирозинированный тубулин, располагаются перпендикулярно антерио-постериорной оси и формируют кольца в антериорной части личинки. Затем появляются аксоны, идущие спереди назад, к моменту метаморфоза их количество увеличивается. Иммуноположительные аксоны находятся на базальной стороне эктодермы (Gröger and Schmid, 2001). На полученных снимках мы, как правило, наблюдали продольные, параллельно идущие волокна в области мезоглеи, поперечное расположение встречалось значительно реже. Колокализация тирозинированного тубулина с серотонином или FMRF-амидом у *G.loveni* не выявлена. При помощи подобной нервной сети могут передаваться сигналы о сокращении мышечных волокон, так как в некоторых местах миофибриллы могут располагаться точно над аксоном, образуя, таким образом, нейроэпителиомышечный контакт (Nakanishi et al., 2008). После начала метаморфоза личинки обоих стрекающих более не включают метки к нейроактивным веществам, по мере прикрепления окрашивание в области подошвы (бывший апикальный орган) быстро пропадает. По-

димому, в период метаморфоза ларвальная нервная система полностью дегенерирует, нервные клетки уходят в апоптоз, как это было показано на *A.aurita* (Nakanishi et al., 2008). Это объясняется сменой жизненной формы со свободно плавающей личинки на жизненную форму прикрепленного полипа. В последнем случае сенсорные клетки не так необходимы, как для активно плавающей формы, которая должна определять направление оптимального перемещения в пространстве. Следовательно, после того, как процесс метаморфоза запущен, нейроактивные вещества теряют свою функциональную нагрузку, и клетки, содержащие их, гибнут.

Заключение

В ходе исследования паттерна нейроактивных веществ на стадиях раннего онтогенеза *Aurelia aurita* (Scyphozoa) и *Gonothyrea loveni* (Hydrozoa) были выявлены как сходства, так и различия между этими представителями двух классов стрекающих. Так, на стадии дробления серотонин содержится в бластомерах эмбрионов обоих видов, а FMRF-амид отсутствует. На этой стадии развития серотонин связан, скорее всего, с контролем процессов дробления и формирования зародыша. Серотонин и FMRF-амид выявлены в клетках апикального органа планул *A.aurita* и *G.loveni*. Как было показано, эти вещества опосредуют сигналы о метаморфозе у многих изученных представителей типа Cnidaria, следовательно, они могут выполнять эту функцию и у рассматриваемых видов. У планул *G.loveni* выявлена нервная сеть, состоящая из продольных и поперечных волокон, идущих в области мезоглеи и включающих метку к

тирозинированному тубулину. Благодаря этой нервной сети клетки личинки могут получать сигналы, идущие от сенсорных клеток апикального органа. После вступления в метаморфоз и при формировании полипоидной стадии исследованные нейроактивные вещества более не выявляются у обоих видов, что свидетельствует о катастрофической перестройке нервной системы, при которой ларвальный тип нервной системы полностью деградирует.

Таким образом, мы видим довольно схожую картину пространственно временных паттернов нейроактивных веществ у *Aurelia aurita* и *Gonothyrea loveni*, что может подтверждать предположения о высоко консервативных механизмах развития внутри типа Cnidaria.

Исследования были выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ и Совета по грантам Президента РФ.

Литература

- Buznikov G. A., Shmukler Yu. B. Possible role of «prenervous» neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // *Neurochem. Res.* 1981. V. 6. P. 55–68.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Willows A.O.D., Nezhlin L.P. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // *Cell Tissue Res.* 2003. V. 311. P. 259–266.
- Emanuelsson H. Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* La Greca and Bacci // *Wilhelm Roux' Archiv.* 1974. V. 175. P. 253–271.
- Emanuelsson H., Carlberg M., Löwkvist B. Presence of serotonin in early chick embryos // *Cell Differentiation.* 1988. V. 24. P. 191–200.
- Fautin D.G. Cnidaria // *Encyclopedia of Reproduction.* 1999. V. 1. P. 645–652.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Williamson M., Hansen G.N. Neuropeptides in cnidarians // *Can. J. Zool.* 2002. V. 80(10). P. 1690–1702.
- Gröger H., Schmid V. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? // *Genesis.* 2001. V. 29. P. 110–114.
- Kass-Simon G., Pierobon P. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview // *Comp. Biochem. Physiol., A.* 2007. V. 146. P. 9–25.
- Katsukura Y., Ando H., David Ch.N., Grimmelikhuijzen C.J.P., Sugiyama T. Control of planula migration by LWamide and RFamide neuropeptides in *Hydractinia echinata* // *J. Exp. Zool.* 2004. V. 207. P. 1803–1810.
- Martin V., Chia F., Koss R. A fine structural study of metamorphosis of the hydrozoan *Mitrocomella polydiademata* // *Journal Of Morphology.* 1983. V. 176. P. 261–287.
- Martin V.J and Chia F. Fine structure of a scyphozoan planula, *Cassiopeia xamachana* // *Biol Bull.* 1982. V. 163. P. 320–328.
- McCauley D.W. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium* // *Developmental Biology.* 1997. V. 190. P. 229–240.
- Nakanishi N., Yuan D., Jacobs D.K., Hartenstein V. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa) // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 511–524.
- Voronezhskaya E.E., Tyurin S.A., Nezhlin L.P. Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora) // *J. comp. neurol.* 2002. V. 444. P. 25–38.
- Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K., Hartenstein V. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 525–539.
- Zega G., Pennati R., Fanzago A., De Bernardi F. Serotonin involvement in the metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* // *Int. J. Dev. Biol.* 2007. V. 51. P. 307–313.

THE ROLE OF NEUROACTIVE SUBSTANCES DURING THE DEVELOPMENT OF CNIDARIA (*AURELIA AURITA* (SCYPHOZOA) AND *GONOTHYRAEA LOVENI* (HYDROZOA)) AND THEIR SPATIAL DISTRIBUTION IN EARLY ONTOGENESIS STAGES

T.D. Orlova, I.A. Kosevich

Moscow State University, Moscow, Russia,
e-mail: planyla@gmail.com, ikos@mail.ru

We investigated the distribution of neuroactive substances during the early ontogenetic stages of *Aurelia aurita* and *Gonothyrea loveni*, namely the cleaving embryos, early planulae, mature planulae, metamorphic stages and young polyps. Antibodies

were used to detect neurosubstances, and LCM to visualize the results. In embryos of both species, almost all blastomers contain serotonin in yolk granules. Early planula of *A. aurita* already possessed serotonin at the aboral pole of larva in the cells of

apical organ, known as a sensory structure. *Gonothyrea loveni* did not show serotonin at the same developmental stage even in the apical organ. Mature planulae of both species contain serotonin and FMRF-amide in their apical organs. Therefore, for the first time in the course of development the FMRF-amide appears at the stage of mature planula. Serotonin and FMRF-amide are believed to play role as transmitters of the metamorphic signals. The tyrosinated tubulin antibodies allowed visualization of the network of nerve cells processes at the base of epiderm in *G.loveni*. Most of the nerve cell processes

lie parallel to the long axis of larva and some other perpendicular to the long axis. In both representatives of cnidarians no neuroactive substances were detected after the onset of metamorphosis.

Hence, we can conclude that the similar spatio-temporal pattern of investigated neurosubstances characterizes the early stages of ontogenesis in *Aurelia aurita* and *Gonothyrea loveni*. It can imply the existence of conservative developmental mechanisms in Cnidarians involving serotonin and FMRF-amide pathways.

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARK, 1819) В КУРОРТНЫХ ЗОНАХ ЧЕРНОГО МОРЯ

Н. В. Панасюк

Южный научный центр РАН, г. Ростов-на-Дону, Россия
e-mail: nikita@ssc-ras.ru

Определены концентрации металлов Cu, Ni, Zn, Fe, Pb в мягких тканях мидий *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819 Черного моря, обитающие в прибрежных водах Сочи, Мацесты и Гагры. Установлено, что мидии из прибрежных вод Мацесты накапливали более высокие концентрации исследуемых металлов. В условиях безводной среды эти моллюски отличались более низкими показателями выживаемости. Можно предположить, наличие взаимосвязи между ослаблением мидий данной популяции и повышенным содержанием тяжелых металлов в воде этой части Черного моря, которые накапливаются в тканях моллюсков.

Введение

Черное море, являясь крупнейшей курортной зоной России, ежемесячно посещается миллионами отдыхающих. В то же время, являясь объектом постоянного антропогенного влияния, Черное море подвержено воздействию промышленных и бытовых стоков, техногенных катастроф и угрозе деградации экосистемы. Все это делает необходимым проведение объективной и своевременной оценки степени поражения, основанной на фундаментальных исследованиях с использованием современных подходов и методов. Одними из важнейших загрязнителей, аккумулирующихся в морских организмах, являются тяжелые металлы (Phillips, Rainbow, 1994).

Тяжелые металлы, в большинстве своем – потенциально токсичны, а некоторые из них, в том числе изучаемый нами свинец, ядовиты даже в относительно низких концентрациях. Двустворчатые моллюски действующие подобно закрепленному фильтру, в первую очередь подвержены накоплению токсических веществ, в том числе тяжелых металлов, попадающих в мо-

ре. Мидия является хорошим биоиндикатором состояния черноморских вод, удовлетворяя всем критериям биоиндикатора (Оскольская и др. 1999, Ugur, 2006). Изучения содержания токсических веществ в мидиях представляется актуальным также из-за участия этого моллюска в пищевой цепи (ракообразные, рыбы, птицы), а так же из-за потребления его в пищу человеком, как в местах отдыха туристов, так и в пищевой промышленности (Александрова и др., 2001).

С целью изучения степени антропогенного воздействия на водные экосистемы Черного моря было исследовано влияние тяжелых металлов (Cu, Ni, Zn, Fe, Pb) на мидий. Определение валового содержания металлов в тканях зачастую не дает представления о степени их биологической опасности для данного вида. В настоящей работе использован двусторонний подход, включающий оценку степени загрязнения по содержанию металлов в тканях мидий, а также оценку степени антропогенного воздействия на организмы – по физиологической устойчивости к стрессу отдельных особей.

Материал и методы

Мы исследовали локальные популяции моллюсков, обитающих в прибрежных водах Сочи (43°35' с.ш. 39°43' в.д.), Мацесты (39°08' с.ш. 43°55' в.д.), Гагры (43°17' с.ш. 40°16' в.д.) в 2007–2009 гг.

Исследовались совокупные пробы мягких тканей мидий, которые накапливают большее количество тяжелых металлов, чем створки (Zeri 2000, Челябинина и др. 2005).

Анализы выполнены с помощью атомной поглощательной спектрофотометрии («Квант-ЗЭТА») в Междисциплинарной аналитической лаборатории Южного Научного Центра РАН

(Панасюк, Лебедева, 2008). Величины концентраций металлов выражены в мкг/г сух. в. Пределы обнаружения металлов составляли: Fe – 0,05 мкг/г; Ni – 0,05 мкг/г; Cu – 0,01 мкг/г; Zn – 1 мкг/г; Pb – 0,01 мкг/г (для навески 5 г). Статистические гипотезы отклоняли на уровне 0,05.

В качестве физиологического маркера влияния загрязнителя на организм мидии мы выбрали физиологическую устойчивость моллюсков в безводной среде (Панасюк, Лебедева, 2008). Данная методика («Stress on stress») успешно используется зарубежными исследователями (Viarengo et. al., 1995), и представляется нам более легко воспроизводимой, чем схожая методика (воздействия анаэробным и аэробным стрессом), описанная в отечественной литературе (Никифоров, Будник, 2004). С каждого участка отобрали по 100 живых мидий равного размера. Их раковины были тщательно очищены и ополоснуты в дистиллированной воде. Моллюски были обложены и накрыты мокрой бумагой, увлажняющейся водой по мере высыхания, и затем помещены в пластиковые кюветы. В течение всего эксперимента моллюсков держали в темном проветриваемом помещении при постоянной температуре 20 °С. Продолжительность жизни моллюсков в безводной среде регистрировали, осматривая и удаляя погибших особей дважды в сутки до гибели последнего животного. По результатам наблюдений для каждой выборки были построены графики.

Результаты и обсуждение

Содержание тяжелых металлов в моллюсках.

Для корректности сравнения мы сравнивали выборки мидий взятых осенью.

Ряды абсолютных величин накопления исследованных химических элементов в мягких тканях исследуемых моллюсков выглядели следующим образом: Fe>Zn > Cu > Pb, Ni. Такое соотношение является характерным для двусторчатых (Денисов и др., 2007 и др.). Соотношение абсолютных величин отличалось в сильно загрязненных участках, например в заливе Сараникос, где преобладало накопление цинка: Zn > Fe>Cu, Ni (Viarengo et. al., 1995; Catsiki et. al., 2003). Следует отметить, однако, что речь шла скорее не о нарушении пропорции накопления, а о повышенном содержании данного металла в тканях (абсолютная величина в несколько раз превышала содержание цинка у российских моллюсков) и, соответственно, в окружающей среде.

Мидии, собранные вблизи Мацесты, показали тенденцию к накоплению максимального, по отношению к остальным станциям, количества всех исследуемых металлов.

У мидий, собранных в прибрежных водах в окрестностях Сочи и Гагры, наблюдались сходные показатели в накоплении 4-х из 5 исследуемых металлов.

Для удобства изложения, данные о содержании металлов, приведены отдельно для каждого элемента (единицы измерения мкг/г).

Железо. Содержание Fe было максимальным в тканях мидий, собранных в прибрежных водах вблизи Мацесты (295,7±8,6). На фактически одинаково низком уровне Fe содержалось в тканях мидий собранных в прибрежных водах Сочи и Гагры (рис. 1 А).

Цинк. Содержание Zn было максимальным в тканях мидий, собранных в прибрежных водах вблизи Мацесты (55,5±5,4). Среднее содержание металла было ниже у мидий собранных в районе Гагры, по сравнению с моллюсками Сочи, однако отличие не было достоверным (рис. 1 Б).

Медь. Содержание Cu было максимальным в тканях мидий, собранных в прибрежных водах вблизи Мацесты (2,8±0,3). В районах Гагры содержание Cu в моллюсках было минимально, показатель в Сочи был несколько выше, но достоверно не отличался (рис. 1 В).

Свинец. Содержание Pb было максимальным у мидий собранных в прибрежных водах вблизи Мацесты (0,3±0,01). На одинаково низком уровне Pb содержался в тканях мидий собранных в прибрежных водах Сочи и Гагры (рис. 1 Г).

Никель. Содержание Ni было максимальным у мидий собранных в прибрежных водах вблизи Мацесты (1,3±0,04). Содержание металла в тканях мидий собранных в прибрежных водах Сочи и Гагры фактически не отличалось (рис. 1 Д).

Выживаемость в безводной среде. Минимальное время жизни на суше составляло 3 дня у мидий из Мацесты, 5 дней у мидий отобранных возле Гагры и 4 дня у мидий отобранных вблизи Сочи. Время гибели 50% тестируемых особей (LD50) варьировало от 4,5 дней для популяции мидии близ Мацесты до 8,9 дней у группы из прибрежных вод в районе Гагры. Для Сочи LD50 – 5,8. Максимальное время жизни на суше для особей из Мацесты, Сочи и Гагры составляло 8, 9 и 13 дней и соответственно (рис. 2). Таким образом, мидии, обитающие вблизи Гагры, демонстрировали более высокую жизнеспособность вне водной среды, в то время как моллюски, добытые в водах возле Мацесты,

оказались более ослабленными. Как было показано выше, в тканях этих мидий наблюдалось повышенное содержание исследуемых металлов. Следует отметить, что мидии, собранные в прибрежных водах Сочи, показали достаточно низкую выживаемость в безводной среде, несмотря на сравнительно низкое содержание тяжелых металлов. Короткое время жизни, на наш

взгляд, могло быть вызвано воздействием других загрязнителей, определение которых не входило в задачи наших исследований (мидии были отловлены недалеко от городского порта). Показатель LD50 этих моллюсков, однако, значительно превышал аналогичный показатель мидий Мацесты, содержащих высокие концентрации исследуемых металлов.

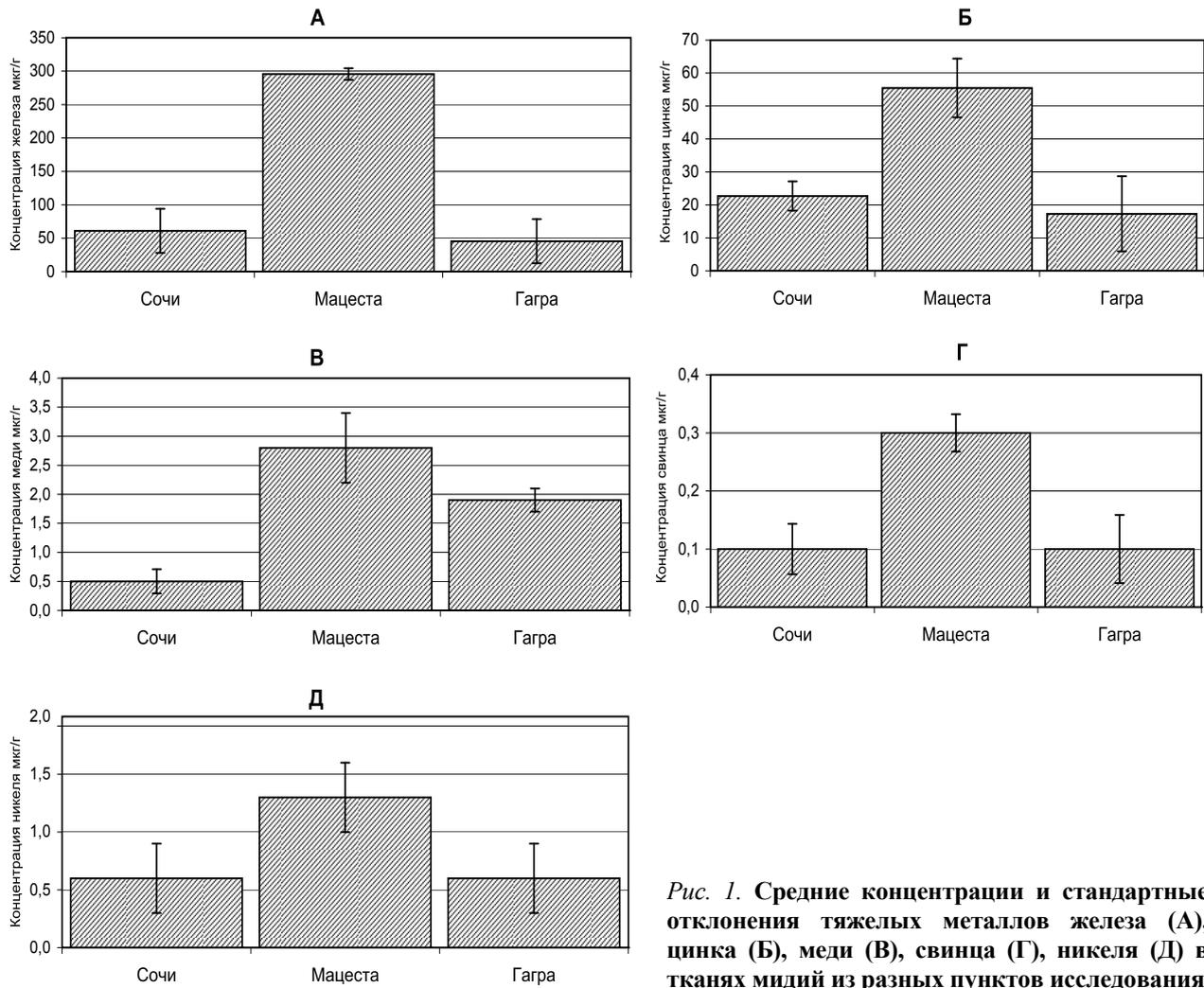


Рис. 1. Средние концентрации и стандартные отклонения тяжелых металлов железа (А), цинка (Б), меди (В), свинца (Г) в тканях мидий из разных пунктов исследования



Рис. 2. Выживаемость мидий из разных пунктов исследования в безводной среде

Наблюдаемая нами картина физиологического стресса у черноморских мидий во многом оказалась сходной с результатами, полученными для этого вида двустворчатых на Средиземном море (Viarengo et. al., 1995, Catsiki et. al., 2003). Показатель LD50 мидий, собранных в заливе Сароникоз Эгейского моря, варьировал от 2,9 до 8,5 дней (нижний показатель был характерен для сильно загрязненного района). Таким образом, показатели LD50 для черноморских мидий перекрывались в максимальном значении с показателями, характерными для наиболее устойчивых к обезвоживанию средиземноморских мидий (Catsiki et. al., 2003).

Максимально устойчивые к стрессу мидии, собранные в водах около Гагры, показали достаточно высокие содержания меди, сопоставимые с концентрациями этого металла у моллюсков Мацесты. Следует однако учитывать, что медь очень быстро выводится из организма (Viarengo et. al., 1995), в то время как скорость выведения из организма металлов, таких как цинк и свинец достаточно невысока (Regoli., Orlando, 1994), что усиливает их токсический эффект. Полученные нами результаты и сравнение с данными других авторов по Средиземноморью, свидетельствуют о влиянии загрязнения тяжелыми металлами, отражающемся на особенностях их концентрирования, на жизнеспособность мидий.

Таким образом, особенности загрязнения конкретного района моря могут проявляться в специфическом спектре распределения тяжелых металлов, по-разному аккумулирующихся в одном и том же виде бентосных животных. Следует отметить, что содержание тяжелых металлов в мидиях

Гагры, Сочи и Мацесты не превышало установленного ПДК (Ермаченко 1997).

Заключение

На основе полученных данных мы можем сделать вывод о неоднородности распределения тяжелых металлов в водах у черноморского побережья. Наибольшее количество металлов накапливалось в мидиях, собранных в прибрежных водах около Мацесты. Накопление металлов у мидий проходило неоднородно, могло наблюдаться повышенное содержание одного металла на фоне снижения содержания других. Выживаемость в безводной среде отличалась у мидий с разным содержанием тяжелых металлов. Используемый нами биомаркер позволяет определить степень воздействия загрязнения на бентосные организмы, в частности на мидию. Наши данные свидетельствуют о более низком показателе устойчивости в условиях стресса вызванного помещением в безводную среду мидий из прибрежных вод Мацесты. Можно предположить, что одним из факторов стресса является высокое содержание в воде этой части Черного моря свинца, цинка и никеля, которые накапливаются в тканях моллюсков. Данные металлы характеризуются медленным выведением из организма и обладают токсическим и мутагенным действием.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднице Междисциплинарной аналитической лаборатории Южного Научного Центра РАН Алешиной Е. Г. за помощь в определении содержания тяжелых металлов в тканях моллюсков, использованных в данном исследовании.

Литература

Александрова О. Л., Солдатов А. А., Головина И. В. Особенности глутатионпероксидной системы в тканях двух цветовых морф черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam // Экология моря. 2001. № 58. С. 22–26.

Ермаченко, Л. А. Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях (методическое пособие). // М.: Наука. 1997. 207 с.

Козинцев А. Ф. Сезонная динамика содержания тяжелых металлов в мидии (*Mytilus Galloprovincialis*) из бухты Казачья Черного моря // Морський екологічний журнал. № 4, Т. V. 2006. С. 41–46.

Никифоров С. М., Будник А. А. Отбор по аллозимным локусам у тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* в условиях стресса // Биология моря. 2004. Т. 30. № 1. С. 54–59.

Оскольская О. И., Тимофеев В. А., Бондаренко Л. В. Влияние загрязнения шельфовой зоны Черного

моря на морфофизиологические характеристики мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam // Экология моря. 1999. Т. 49. С. 84–89.

Панасюк Н. В., Лебедева Н. В. Мидия (*Mytilus Galloprovincialis* Lamark, 1819) В биоиндикации загрязнения Черного моря // Вестник ЮНЦ РАН. 2008. Т. 4. № 4. С. 68–74.

Челядина Н. С., Вялова О. Ю., Л. Л. Смирнова Содержание Zn, Cu, Pb, Cd в гонадах культивируемых *Mytilus Galloprovincialis* Lam. // Морський екологічний журнал 2005. Т. 4. № 1. С. 119–125.

Catsiki V.A., Kozanoglou C., Strogyloudi E. Monitoring of the effects of pollution along the Saronikos gulf. Report 2001–2002. NCMR. 2003. 51 Pp.

Machado L. M., Bebianno M. J., Boski T. and Moura D. M. Trace metals on the Algarve coast, II: Bioaccumulation in mussels *Mytilus galloprovincialis*

(Lamarck, 1819)// Bol. Inst. Esp. Oceanogr. V. 15. № 1–4. 1999. P. 465–471.

Phillips D.J.H., Rainbow P.S. Biomonitoring of trace aquatic contaminants // Environmental Management Series. Chapman & Hall. London. 1994. P. 47–51.

Regoli F., Orlando, E. Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment // Mar. Pollut. Bull. 1994. V. 28. P. 592–600.

Ugur S. Trace metal levels in mussels (*Mytilus galloprovincialis* L. 1758) from Turkish Aegean Sea

coast //Environmental Monitoring & Assessment. 2006. V. 114. № 1–3. P. 273–286.

Viarengo A., Canesi L., Petrica M., Mancinelli G., Accomando R., Smaal A. C., Orunesu M. Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels // Marine environmental Research. 1995. V. 39. P. 245–248.

Zeri C., Voutsinou-Taliadouri F., Romanov A. S., Ovsjany E., Moriki A. F. Comparative approach of dissolved trace element exchange in two interconnected basins: Black Sea and Aegean Sea // Mar. Poll. Bull. 2000. V. 40. № 8. P. 666–673.

THE INFLUENCE OF THE MAN-CAUSED POLLUTION ON VIABILITY OF MUSSEL MYTILUS GALLOPROVINCIALIS (LAMARK, 1819) IN RESORT AREAS OF THE BLACK SEA

N.V. Pansyuk

South Research Centre of RAS, Rostov-on-Don, Russia
e-mail: nikita@ssc-ras.ru

The data on the contents of heavy metals (copper, nickel, zinc, iron and lead) in tissues of mussels *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 of the Black sea are resulted in this publication. Three populations of mollusks living in coastal waters of the Sochi, Macesta and Gagra are investigated. Population from more polluted site

(concentration of all metals in mollusk tissues were higher) characterized by lower stability under stress (the waterless environment). Authors assume that the stress (biomarker of pollution) could be determinate by water pollution by heavy metals that was accumulated in tissues of mussels.

ГАЗООБРАЗНЫЕ ПОСРЕДНИКИ В СТВОЛЕ И ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ СИМЫ *ONCORHYNCHUS MASOU*

Е. В. Пущина

Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток, Россия
e-mail: puschina@mail.ru

Введение

В настоящее время появляется все больше доказательств использования позвоночными разнообразных путей передачи сигналов в процессе регуляции гомеостаза. Существенную роль в этом процессе играют молекулы NO, CO и H₂S. Эти газообразные посредники, известные как газотрансмиттеры (Wang, 2002) являются общепризнанными токсическими газами. Существует ряд критериев, которым должны соответствовать газотрансмиттеры в ЦНС 1) молекулы должны существовать в виде газа, 2) свободно проникать сквозь мембрану, 3) вырабатываться эндогенно, и их синтез должен регулироваться ферментами, 4) осуществлять определенные функции в физиологических концентрациях, 5) иметь специфические клеточные и молекулярные мишени (Wang, 2002). По сравнению с традиционными исследованиями процессов сигнализации при нейро- и эндокринных взаимодействиях, изучение межклеточных коммуникаций посредством газообразных посредников началось сравнительно недавно. NO стал первым газотрансмиттером, идентифицированным в пионерских исследованиях на изолированных кровеносных сосудах Furchgott и Zawadzki (1980). H₂S изначально был описан как фактор, участвующий в нейрональной активности (Abe, Kimura, 1996), позднее были установлены его вазорелаксирующие свойства (Hosoki et al., 1997). Не смотря на несколько запоздалое начало изучения физиологии газотрансмиттеров, они зарекомендовали себя в качестве биологически значимых и клинически важных посредников, а количество цитированных за последнее время работ по NO превысило 80 000 (Pacher et al., 2007). Исследование физиологии газотрансмиттеров в ЦНС немлекопитающих позвоночных в настоящее время существенно отстает, не смотря на возможность исследования

сложных и многообразных механизмов у животных и формирования более полного представления об эволюционном преобразовании газообразных сигналов в ЦНС позвоночных.

Целью настоящей работы является сравнительное исследование распределения NO- и H₂S- продуцирующих систем в продолговатом мозге и стволе тихоокеанской симы *Onchorhynchus masou*.

Материалы и методы

Исследование проводили на 20 особях 3-х годовалой симы *Onchorhynchus masou*, полученной с Рязановского экспериментально-производственного рыболовного завода в 2009 году. Животных содержали в аквариумах с аэрируемой морской водой при температуре 17–18 °С; анестезировали, помещая в кювету с 1% раствором MS-222 на морской воде на 10–15 мин.

Гистохимическое исследование активности NADPH-d (НФ 1.6.99.1) проводили в соответствии с общепринятой методикой идентификации NADPH-d (Hope, Vincent, 1989), адаптированной нами для головного мозга рыб (Пущина, 2007). Контрольные препараты помещали в среду с добавлением ингибитора NO-синтазы 10 мМ N-монометил-L-аргинина. Препараты просматривали и фотографировали на микроскопе Axiovert Apotome. Для измерения оптической плотности выпадающего в цитоплазме нейронов преципитата ЕОП (единицы оптической плотности) микропрепараты снимали на цифровую фотокамеру микроскопа и обрабатывали с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop 7. Исходный уровень оптической плотности (УОП) измеряли на контрольных препаратах. Статистическую обработку материала производили с помощью пакетов программ Statistica, Excel. При обработке результатов применяли параметрический метод анализа (*t*-тест Стьюдента).

Иммуногистохимическое выявление нейрональной nNOS проводили методом непрямого стрептавидин-биотинового маркирования на свободноплавающих срезах. Для выявления H2S продуцирующих структур использовали авидин-биотин-пероксидазное маркирование цистатионин β -синтазы (CBS). Мозг животных фиксировали в 4% растворе параформальдегида приготовленном на 0,1 М фосфатном буферном растворе (pH 7,2), в течение 2 ч при 4°C. Материал промывали в течение 1 сут в 30% растворе сахарозы и готовили на криостате поперечные срезы толщиной 50 мкм. Для ингибирования активности эндогенной пероксидазы, свободноплавающие срезы в течение 30 мин при комнатной температуре инкубировали с 1% раствором перекиси водорода на 0,1 М фосфатном буфере; для устранения неспецифического окрашивания (фона) срезы инкубировали с 1% неиммунной сывороткой лошади на 0,1 М фосфатном буфере при комнатной температуре в течение часа. Срезы инкубировали с поликлональными антителами мыши против цистатионин β -синтазы (Abcam ab54883), (1 : 5 000) при 4 °C в течение 1 сут и первичными поликлональными антителами кролика против nNOS (ICN, USA), (1 : 5000) при температуре 4 °C в течение 1 сут. Для иммуномечения CBS срезы инкубировали с вторичными биотинилированными антителами лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Labs, Burlingame, USA), а для иммуномечения nNOS – с вторичными биотинилированными антителами козы против иммуноглобулинов кролика (Biomedicals, Germany) при комнатной температуре в течение 2 ч. Для визуализации иммуногистохимического маркирования CBS использовали стандартный ABC набор (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, USA). Для визуализации иммуногистохимического маркирования nNOS срезы инкубировали с стрептавидин-пероксидазным комплексом (Biomedicals, Germany). Для выявления продуктов реакции nNOS использовали субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, USA), а для выявления CBS субстрат синего цвета, контролируя процесс развития окрашивания под микроскопом; срезы промывали в воде, монтировали на предметные стекла, обезживали по стандартной методике и заключали в бальзам.

Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Срезы мозга, вместо первичных антител, инкубировали с 1% неиммунной сывороткой лошади в течение 1 сут и далее проводили как с первичными антителами. Во всех контрольных экспериментах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

Результаты и обсуждение

NOS-иммунореактивные (NOS-ир) и NADPH-d-позитивные нейроны были обнаружены в составе висцеросенсорных V, VII, IX-X и висцеромоторных III, IV и VI ядер ч/м нервов, октаво-латерального эфферентного комплекса, ретикулоспинальных нейронов (РСК), медиальной ретикулярной формации (МРФ). Цистатионин β -синтаза (CBS) в продолговатом мозге симы была выявлена в нейронах ядра X нерва, РСК и вентро-латеральной ретикулярной формации. Распределение NOS-ир и CBS-ир нейронов в ядрах продолговатого мозга симы указывает на то, что у симы NO является преобладающим нейромодулятором висцеросенсорных систем продолговатого мозга, а H2S, вероятно, модулирует лишь нисходящие двигательные системы. Морфометрические параметры NADPH-d-позитивных, nNOS-ир и CBS-ир клеток в исследованных структурах мозга симы и уровень активности в них NADPH-d представлены в таблице. В соответствии с классификацией Аревало с соавторами (Arevalo et al., 1995) были идентифицированы следующие клеточные типы: I тип – сверхкрупные мультиполярные клетки с 1–5 первичными дендритами, размером тела от 40 мкм и более; II – крупные и среднего размера клетки с тремя или более дендритами, размер клеточного тела составляет 25–40 мкм; III тип – среднего размера клетки с 1–3 отростками, лишенными варикозных утолщений и размером тела 15–25 мкм; nNOS-иммунолокализация в **X-IX ядрах** симы обнаружена в клетках II типа вентральной и вентро-латеральной зонах ядра, а также волокнах и клетках глии (рис. 1 А). Умеренная активность NADPH-d присутствует в клетках II типа, грушевидной или круглой формы (рис. 1 Б, таблица). Уровень активности NADPH-d в ядрах блуждающего и языкоглоточного нервов высокий (рис. 2). CBS-иммунолокализация была обнаружена в нейронах I-II типов дорсальной части ядра X нерва (рис. 1 В). В **октаво-латеральном** комплексе NADPH-d/nNOS маркирует нейроны I-II типов (рис. 1 Г), с 1–2 слабо разветвленными дендритами. Суммарный уровень гистохимической активности NADPH-d в ядрах октаво-латерального комплекса симы умеренный (рис. 2). В ядре **лицевого** нерва nNOS маркирует нейроны I-II (рис. 1 Г), УОП выпадающего в цитоплазме нейронов преципитата низкий (рис. 2). Иммунолокализация nNOS в ядре VII нерва совпадает с распределением NADPH-d (рис. 1 Д). Нейроны грушевидной и овальной формы, имеющие 1–3 слабо маркированных дендрита, прилегают вентро-латерально к просвету мозгового желудочка (рис. 1 Г, Д).

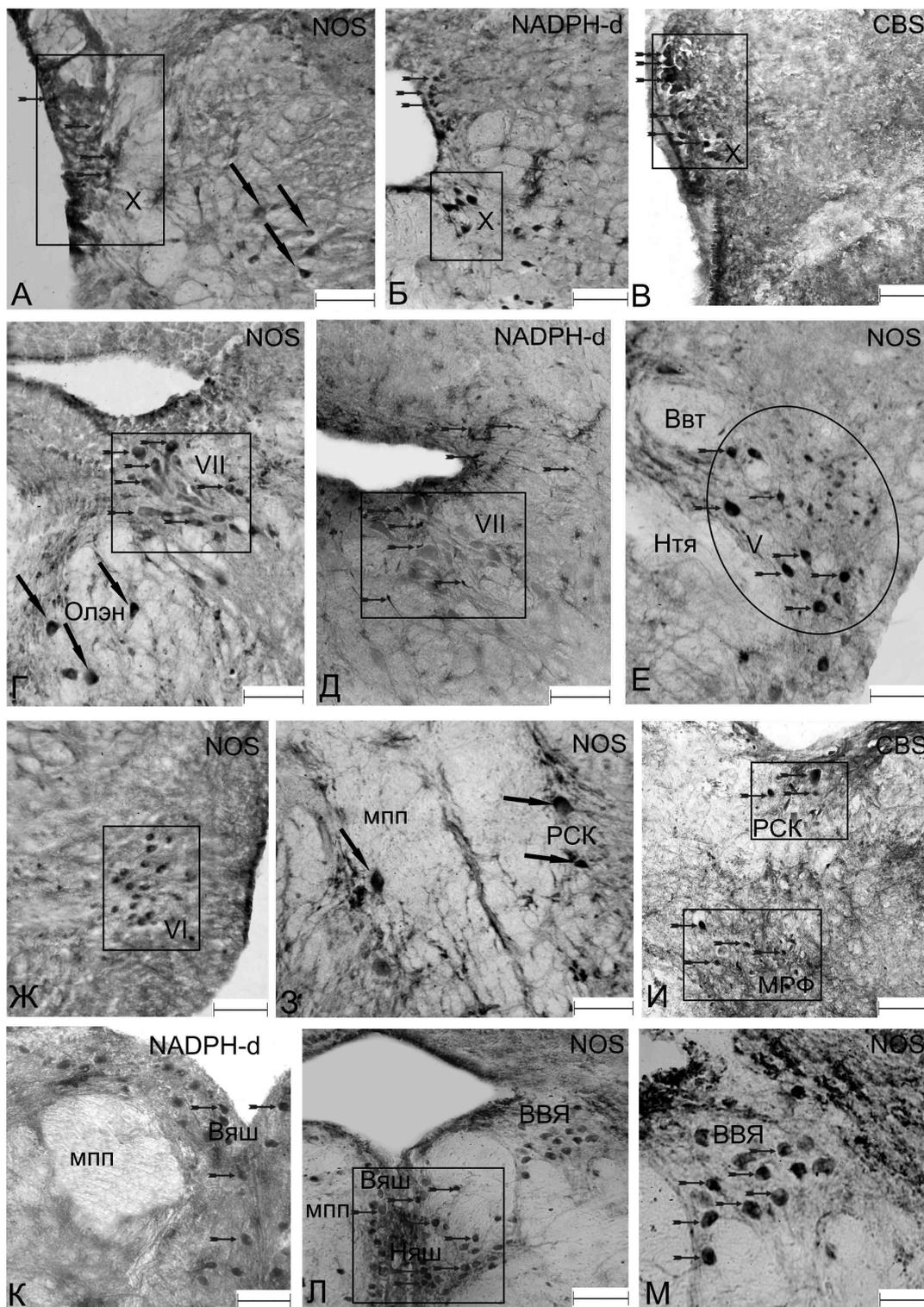


Рис. 1. Распределение NADPH-d, nNOS- и CBS-иммунопозитивных клеток в продолговатом мозге и стволе симы *Onchorhynchus masou*.

А, Б, В – nNOS, NADPH-d и CBS-иммунолокализация в ядре X нерва, мелкие стрелки обозначают нейроны в составе ядра, крупные стрелки – иммунопозитивные нейроны в вагусной области; Г – NOS в ядре VII нерва, мелкими стрелками показаны NOS-ир нейроны, крупные обозначены октаво-латеральные эфферентные нейроны (Олэн), Д – NADPH-d в ядре VII нерва, мелкими стрелками обозначена NADPH-d-позитивная глия, Е – NOS в ядре V, мелкие стрелки указывают на NOS-ир нейроны I-II типов, Ввт – вторичный вкусовой тракт, Нтя – нисходящий тракт тройничного нерва, Ж – NOS-ир в ядре VI нерва, З, И – NOS и CBS в ретикулярной формации, крупными стрелками показаны NOS-ир ретикулоспинальные (РСК) клетки, мелкими стрелками – CBS-ир РСК и клетки МрФ, К, Л – NADPH-d и NOS в ядре шва, Вяш – верхнее ядро шва, Нвяш – нижнее ядро шва, М – NOS во вторичном вкусовом ядре, стрелками обозначены NOS-ир клетки. Масштаб: А, В, Е, З, К – 100 мкм; Б, Г, Д, Ж, И, Л – 200 мкм, М – 50 мкм

В главном **ядре тройничного (V)** нерва низкая активность NADPH-d выявлена в нейронах I типа, грушевидной или овальной формы, имеющие 1–3 дендрита, одиночных либо образующих небольшие скопления (рис. 2). В латеральной части ядра V nNOS маркирует крупные (I типа), в медиальной – средние (II типа) и мелкие клетки (рис. 1 Е). Наиболее интенсивно маркированы nNOS средние мультиполярные клетки с 1–3 от-

ростками в вентро-латеральной части главного ядра V (рис. 1 Е). В ядрах глазодвигательного (III), блокового (IV) и отводящего (VI) нервов NADPH-d слабо либо умеренно маркирует перикарионы клеток II типа и начальные сегменты их дендритов, слабо реагируют тела более мелких нейронов (рис. 2, таблица). Иммунолокализация nNOS в ядрах глазодвигательного комплекса выявлена в клетках II типа (рис. 1 Ж).

Морфометрические характеристики NADPH-d, nNOS- и CBS-ир клеток продолговатого мозга и ствола симы *Onchorhynchus masou*

Область мозга	NADPH-d Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al., (1995)*	Активность (ЕОП) NADPH-d	nNOS Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al., (1995)*	CBS Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al., (1995)*
Продолговатый мозг				
Ядро блуждающего (X) нерва	28,2±1,4/16,5±2,7 II	122,2±2,9 – II	29,2±3,7/12,5±2,7 II 43±5,7/19±4,8 I	33,4±6,9/15,6±5,6 II 41±5,9/23,3±6,9 I
Ядро языкоглоточного (IX) нерва	26±5,4/20,5±2,3 II	116,6±6,4 – II	28±4/18,5±3 II	–
Октаво-латеральные (VIII) ядра	26±2,4/15,8±3,2 II	105,6±3,3 – II	25±3,4/16,2±4,2 II 44,5±5,1/21,1±7,1 I	–
Ядро лицевого (VII) нерва	43,2±4,3/20,3±4 I 21,8±4,2/17,4±5 II	60,1±5,4 – I 67,2±3 – II	23,8±3,2/18,2±18 II 46,7±6,2/23,3±2 I	–
Ядро отводящего (VI) нерва	19,3±5,2/17,2±4,3 II	65,1±6,7 – II	21,1±3,2/ 14,2±6,5 II	–
Ядро тройничного (V) нерва	45,5±3,2/24,7±5,6 I 27,4±1,2/26,2±3,8 II	86±8 – I 92±4,2 – II	29,4±3,2/21,2±4,8 II 42,5±5/21,7±3,6 I	–
Ретикулоспинальные клетки	46,4 ±3,1/25,6±6,1 I	84±17,3 – I	44,2 ±4,1/22,6±2,1 I	44,8±3,5/20,5±3,1 I
Межпучковые клетки	44,2±3,7/ 24±2,2 I 25,2±4,8/19,6±3,8 II	102±12 – I 96 ±8,9 – II	27±3,8/18,2±4 II 43,2±2,2/ 29±6,2 I	21±3/13,2±2,9 II 42,7±1,8/32,2±7,8 I
Перешеек (Мост)				
Верхнее ядро шва	8,5±3,6/4,9±2,7 III	116,6±7,1 – III	9,6±2,2/5,4±1,7 III	–
Нижнее ядро шва	7,9±2,3/5,6±1,4 III	119,4±5 – III	8,7±0,3/3,6±0,4 III	–
Вторичное вкусовое ядро	23,4±7,4/17,4±3,4 II	111,5±5,4- II	25,4±3,4/20,4±1,4 II	–
Средний мозг				
Ядро глазодвигательного нерва (III)	24±3,2/17,5±8,2 II	123,2±2,4 – II тип	22,8±1,2/15,2±18 II	–
Ядро блокового (IV) нерва	22,4±4,7/19,3±7,5 II	102,2±1,8 – II тип	19±2,8/ 15,2±2,5 II	–

* Размеры клеток указаны через черту, римскими цифрами указаны типы клеток по классификации Аревалло (1995).

Общим свойством всех рассмотренных NADPH-d/nNOS продуцирующих ядер продолговатого мозга симы является их холинергическая природа (Пушина, Карпенко, 2007). Холинергический путь нейротрансмиссии является мощным модулятором синаптической и метаболической активности эфферентных парасимпатических систем. Такое свойство сомато-висцеральных ядер и эфферентных октаво-латеральных комплексов установлено для различных видов рыб (Perez et al., 2000; Пушина, Карпенко, 2007). Таким образом, в холинергических парасимпатических ядрах продолговатого мозга симы NO выступает в качестве нейромодулятора. Наряду с холинергической, в ядрах продолговатого мозга рыб показано наличие других медиаторных систем. У угря *Anguilla anguilla* выявле-

ны ГАМК-иммунореактивные нейроны в составе ядер IX и X нервов (Medina et al., 1994). Электрофизиологическими методами установлено, что стимуляция сенсорных волокон вагуса карпообразных приводит к активации ионотропных НМДА рецепторов (Sharp, Finger 2002), играющих ключевую роль в преобразовании вкусовой информации. Именно в этих ядрах у симы были выявлены CBS-ир нейроны. Показано, что H₂S регулирует ГАМК-ергические рецепторы В типа, на пре- и постсинаптических позициях (Qu et al., 2008). Стимуляция постсинаптических GABA_B рецепторов порождает долговременные тормозные постсинаптические потенциалы, увеличивающие ток катионов K⁺, необходимых для тонкой настройки тормозной нейротрансмиссии. В пресинаптических областях GABA_B рецепторы

регулируют высвобождение ГАМК и глутамата, ингибируя потенциалзависимые Ca^{2+} каналы. Таким образом, в ядре X нерва и клетках МРФ H2S может модулировать активность ГАМК-ер-

гических рецепторов, участвуя тем самым в поддержании баланса между возбуждением и торможением в медуллярном и спинальном отделах мозга.

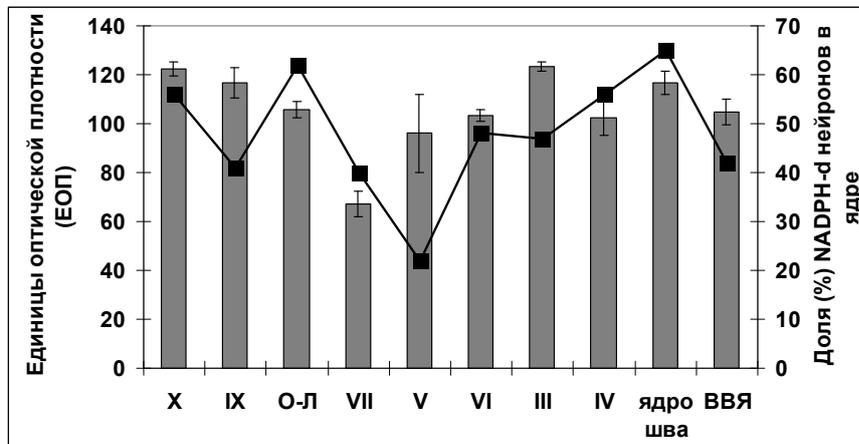


Рис. 2. Гистохимическая активность NADPH-d в ядрах ствола и продолговатого мозга симы *Oncorhynchus masou*. Гистограммы показывают уровень оптической плотности (УОП) преципитата ($M \pm m$), график отражает долю NADPH-d-позитивных нейронов в ядрах. По оси абсцисс исследованные ядра ствола и продолговатого мозга

В перивентрикулярной области продолговатого мозга симы были идентифицированы клетки с высокой активностью NADPH-d (рис. 1 Д). На основании морфотопографических критериев обнаруженные клетки были отнесены к радиальной глии. NADPH-d-позитивные клетки расположены в перивентрикулярной зоне, соответствующей области первичной пролиферации. В настоящее время сравнительно мало известно о функциональной роли различных изоформ NOS в морфогенетических процессах. В отличие от млекопитающих, мозг телеостей обладает высокой нейрональной пластичностью и способен продуцировать новые клетки в течение всей жизни (Wulliman and Puellas, 1999). Результаты исследования указывают на наличие nNOS и NADPH-d в глиальных клетках симы. Исследования показали (Platel et al., 2010), что некоторые нейротрансмитеры, локализуясь в клетках-предшественницах перивентрикулярной области мозга, могут выступать в качестве регуляторов постнатального нейрогенеза (adult neurogenesis). Ранее сообщалось, что NO участвует в качестве сигнальной молекулы, регулирующей процессы направленного роста аксонов и дендритов, а также миграции дифференцирующихся нейронов (Bicker, 2005). Результаты проведенного исследования позволяют предполагать, что в перивентрикулярной области продолговатого мозга симы NO может выступать в качестве регулятора постнатального нейрогенеза.

Между скоплением нейронов лицевого ядра и областью тройничного нерва встречаются

крупные nNOS-ир клетки I-II типов (рис. 1 З), относящиеся к ретикулоспинальным клеткам медиальной ретикулярной формации. Такие нейроны были также иммуномаркированы CBS (рис. 1 И). nNOS и CBS-иммунолокализация в межпучковых, интерфасцикулярных по классификации Ма (1997) клетках идентифицирована впервые. Межпучковые клетки (МПК) продолговатого мозга рыб выполняют функцию локальных интернейронов в составе нисходящих двигательных систем продолговатого и спинного мозга. Показано, что такие нейроны морфологически и функционально гетерогенны (Ма, 1997), а результаты настоящего исследования указывают и на нейрохимическую гетерогенность МПК. Местоположение МПК вблизи крупных продольных трактов, а также принадлежность к медиальной ретикулярной формации, позволяет предполагать, что такие нейроны участвуют в пространственной интеграции, в частности, при координации двигательных рефлексов. Мы считаем, что межпучковые CBS-ир и nNOS-ир нейроны симы представляют раздельные субпопуляции ретикулоспинальных клеток, модулирующие ГАМК- и холинергические системы продолговатого мозга.

Верхнее и нижнее ядра шва симы содержат небольшие умеренно маркированные NADPH-d клетки III типа (рис. 1 К, 2). nNOS иммунолокализация в ядрах шва симы выявлена в нейронах II и III-го типа (рис. 1 Л). Наличие NO-продуцирующих нейронов и высокий УОП NADPH-d в ядрах шва и сенсорной части ядра тройничного

нерва, возможно, указывает на участие NO в опицеptiveй модуляции головного мозга. Показано, что оксид азота является мощным модулятором серотонинергической функции мозга за счет совместной локализации с 5-НТ в нейронах шва костистых рыб (Пушина, Дюйзен, 2004). У млекопитающих H₂S участвует в гиперполяризации нейронов дорсального ядра шва путем увеличения оттока K⁺ через АТФ-зависимые калиевые каналы (Qu et al., 2008). В исследовании на симе H₂S-продуцирующие нейроны в ядрах шва обнаружены не были. Полученные результаты позволяют предполагать модулирующее воздействие оксида азота на супраспинальные серотонинергические эфференты, расположенные в верхнем и нижнем ядрах шва, МРФ и спинном мозге.

Нейроны вторичного вкусового ядра (ВВЯ) умеренно маркированы NADPH-d (рис. 2) и интенсивно маркированы nNOS (рис. 1 М). ВВЯ рассматривается в качестве висцерального интегративного центра продолговатого мозга рыб (Finger, 1983). Весьма вероятно, что при участии H₂S и NO-продуцирующих систем в мозге рыб осуществляется модуляция сенсорных функций, связанных с интра- и экстракраниальной оценкой положения пищи в пространстве и местных либо уда-

ленных релейных механизмов координации механосенсорной, зрительной и вкусовой функций.

Результаты проведенного исследования показывают наличие NO- и H₂S-продуцирующих нейронов стволовом и медуллярном отделах мозга симы. NOS-ир и NADPH-d-позитивные нейроны были обнаружены в составе висцеросенсорных (V, VII, IX-X) и висцеромоторных (III, IV и VI) ядер ч/м нервов, октаво-латерального эфферентного комплекса, ретикулоспинальных нейронов, медиальной ретикулярной формации. Цистатианин β-синтаза в продолговатом мозге симы была выявлена в нейронах ядра X нерва, ретикулоспинальных клетках и вентро-латеральной ретикулярной формации. Распределение NO-ергических и H₂S-продуцирующих нейронов в ядрах продолговатого мозга симы указывает на то, что у симы NO является преобладающим нейромодулятором висцеросенсорных систем продолговатого мозга, а H₂S, вероятно модулирует лишь нисходящие двигательные системы. Результаты проведенного исследования позволяют предполагать, что в перивентрикулярной области продолговатого мозга симы NO может выступать в качестве регулятора постнатального нейрогенеза.

Литература

Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996. V. 16. P. 1066–1071.

Arevalo R., Alonso J.R., Garcia-Ojeda E., Brinón J.G., Crespo C., Aijón J. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). *J. Comp. Neurol*. 1995. V. 352. P. 398–420.

Bicker G. Stop and go with NO: nitric oxide as regulator of cell motility in simple brains. *BioEssays*. 2005. V. 27. P. 495–505.

Finger T.E. The gustatory system in teleost fish. 1983. In R.G. Northcutt and R.E. Davis (eds): *Fish Neurobiology*, vol. 1. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press, pp. 285–309.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980. V. 288. P. 373–376.

Hope B. T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem*. 1989. V. 37. P. 653–661.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997. V. 237. P. 527–531.

Ma P.K. Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *J Comp. Neurol*. 1997. V. 381. P. 411–427

Medina L, Puelles L, Smeets W.J. Development of catecholamine systems in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol*. 1994. V. 350. P. 41–62.

Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev*. 2007. V. 87. P. 315–424.

Perez S., Yanez J., Marin O., Anadon R., Gonzalez A., Rodriguez-Moldes I. 2000. Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *J. Comp. Neurol*. V. 428. P. 450–474.

Platel J.C., Stamboulian S., Nguyen I., Bordey A. *Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: the first leg*. *Brain Res. Rev*. 2010. V. 63. P. 60–71.

Qu K, Lee S.W., Bian J.S., Low C.M., Wong P.T. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int*. 2008. V. 52. P. 155–165.

Sharp A., Finger T. GABA-ergic modulation of primary gustatory afferent synaptic efficacy. *J Neurobiol.* 2002. V. 52. P. 133–43.

Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 2002. V. 16. P. 1792–1798.

Wulliman, M. and Puellas, L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains, *Anat. Embryol.* 1999. V. 329. P. 329–348.

Пущина Е. В. Нитроксидергическая организация ядер краниальных нервов продолговатого мозга костистых рыб. *Цитология.* 2007. Т. 49. № 6. С. 471–483.

Пущина Е. В., Дюйзен И. В. Структура и нейрохимические особенности ядер шва костистых рыб. *Морфология.* 2004. Т. 125. № 2. С. 32–37.

Пущина Е. В., Карпенко А. А. Распределение холинацетилтрансферазы (ChAT) в ядрах перешейка и продолговатого мозга у костистой рыбы *Onchorhynchus masu*. Исследование восходящей мезопонтинной холинергической системы с помощью карбоцианинового красителя (DiI). *Цитология.* 2007. Т. 49. № 7. С. 581–593.

NO- AND H₂S-PRODUCING CELLS PRESENCE IN THE BRAIN STEM AND MEDULLAR PART OF THE SALMON *ONCHORHYNCHUS MASOU* BRAIN

E.V. Pushchina

*Institute of Marine Biology Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok,
e-mail: pushchina@mail.ru*

Histochemical labeling of NADPH-diaphorase and immunohistochemical labeling of nitric oxide synthase (NOS) and cystathionine β-synthase (CBS) in the brainstem of salmon *Onchorhynchus masou* were used to identify the NO-ergic and H₂S-producing neurons distribution. Results of the research show the NO- and H₂S-producing cells presence in the brain stem and medullar part of the *Onchorhynchus masou* brain. NOS-immunoreactive and NADPH-d-positive neurons were revealed in viscerosensory (V, VII, IX-X) and visceromotory (III, IV, VI) cranial nuclei, octavo-

lateral efferent neurons, reticulospinal cells and medial reticular formation. Cystathionine β-synthase was identified on the medullar level in X nucleus, reticulospinal cells and ventro-lateral reticular formation. The distribution of NO-ergic and H₂S-producing neurons in the medullar nuclei indicate that NO is a prevalent neuromodulator of viscerosensory systems of medulla, but H₂S probably modulated descending motor systems only. Our results also allow to suppose, that NO in periventricular medullar area can regulate the adult neurogenesis.

NO И H₂S В ИНТЕГРАТИВНЫХ ЦЕНТРАХ МОЗГА СИМЫ *ONCORHYNCHUS MASOU*

Е. В. Пущина¹, Д. К. Обухов²

¹Институт биологии моря имени А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток,

²Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
e-mail: puschina@mail.ru

Введение

Интегративные системы мозга позвоночных координируют целостные реакции организма животного в ответ на различные сенсорные сигналы. У млекопитающих и человека насчитывают 9 интеграционных систем мозга (Мотавкин, 2003), тогда как у костистых рыб выделено только 3 интегративных центра: конечный мозг, крыша среднего мозга и мозжечок (Wullimann, 1997). Сведения об участии газообразных транмиттеров в передаче нервного импульса у костистых рыб весьма фрагментарны, однако показано (Holmqvist et al., 1994), что распределение NO-продуцирующих нейронов в интегративных центрах мозга у рыб наименее постоянно.

Оксид азота является универсальной, распространяющейся путем диффузии, молекулой, физиологические эффекты которой направлены на нейромодуляцию, восстановительные функции, иммунный ответ и вазодилатацию (Bredt, Snyder, 1992). Молекула NO синтезируется тремя формами NO-синтаз: нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS). Не смотря на то, что у млекопитающих NO-синтезирующие системы хорошо изучены, сравнительно мало известно об экспрессии специфических изоформ в мозге и/или индивидуальной функциональной роли различных изоформ NOS в морфогенетических процессах. Сходство с NO-продуцирующими комплексами млекопитающих на молекулярном уровне было обнаружено только у одного вида – Атлантического лосося (Holmqvist et al., 1998). Было показано, что nNOS широко экспрессируется в мозге этого вида лососей (Holmqvist et al., 1998), а генетическая последовательность NO-синтезирующих ферментов соответствует последовательности nNOS и iNOS млекопитающих (Quan et al., 2000). Эндотелиальная форма синтазы окиси

азота (eNOS) в ЦНС рыб обнаружена не была, но в крови и тканях мозга рыб были выявлены значительные эндогенные концентрации сульфидов, что вызвало значительный интерес к исследованию H₂S-продуцирующих систем в организме рыб (Olson, Donald, 2009).

Целью настоящей работы является сравнительное исследование иммулокализации нейрональной синтазы окиси азота (nNOS) и цистатионин β-синтазы (CBS) в интегративных центрах мозга: мозжечке, зрительном тектуме и конечном мозге тихоокеанской симы *Onchorhynchus masou*.

Материал и методы

В работе использовали материал от 10 особей трёхгодовалой симы *Onchorhynchus masou*, полученной с Рязановского экспериментально-производственного рыболовного завода в 2009 году. Иммуногистохимическое выявление нейрональной синтазы окиси азота nNOS и цистатионин β-синтазы (CBS) проводили с помощью стандартного стрептавидин-биотинового и пероксидазного маркирования на свободноплавающих срезах. Срезы инкубировали с поликлональными антителами мыши против цистатионин β-синтазы (Abcam ab54883), (1: 5 000) или первичными поликлональными антителами кролика против nNOS (ICN, USA), (1:5000) при температуре 4° С в течение 1 сут. Для визуализации иммуногистохимического маркирования CBS и nNOS использовали стандартные наборы (Vectastain Elite ABC Kit, Burlingame, USA; Biomedicals, Germany). Для выявления продуктов реакции nNOS использовали субстрат красного цвета (VIP Substrate Kit, Vector Labs, Burlingame, USA), а для выявления CBS – субстрат синего цвета. Процесс окрашивания контролировали под микроскопом, срезы промывали

в воде, монтировали на предметные стекла, обезвоживали по стандартной методике и заключали в бальзам. Идентификацию нейронов приводили в соответствие с классификацией Аревало (1995), согласно которой были выделены следующие типы клеток: I тип – сверхкрупные мультиполярные клетки с 1–5 первичными дендритами, размером тела от 40 мкм и более; II – крупные и среднего размера клетки с тремя или более дендритами, размер клеточного тела составляет 25–40 мкм; III тип – клетки среднего размера с 1–3 отростками, лишенными варикозных утолщений и размером тела 15–25 мкм; IV тип – мелкие клетки, округлой, овальной, либо биполярной, формы тела размером 6–15 мкм; V тип – сверхмалые клетки с размерами тел менее 6 мкм.

Для сравнительной характеристики интенсивности маркирования nNOS и CBS использовалось измерение оптической плотности продуктов ИГХ маркирования. Измерения оптической плотности (ЕОП – единицы оптической плотности) проводили на микроскопе Axiovert Arotome и обрабатывали с помощью программного обеспечения Adobe PhotoShop 7. При обработке результатов применяли параметрический метод (*t*-тест Стьюдента) анализа. Данные обрабатывали при помощи пакетов программ Statistica, Excel.

Результаты и обсуждение

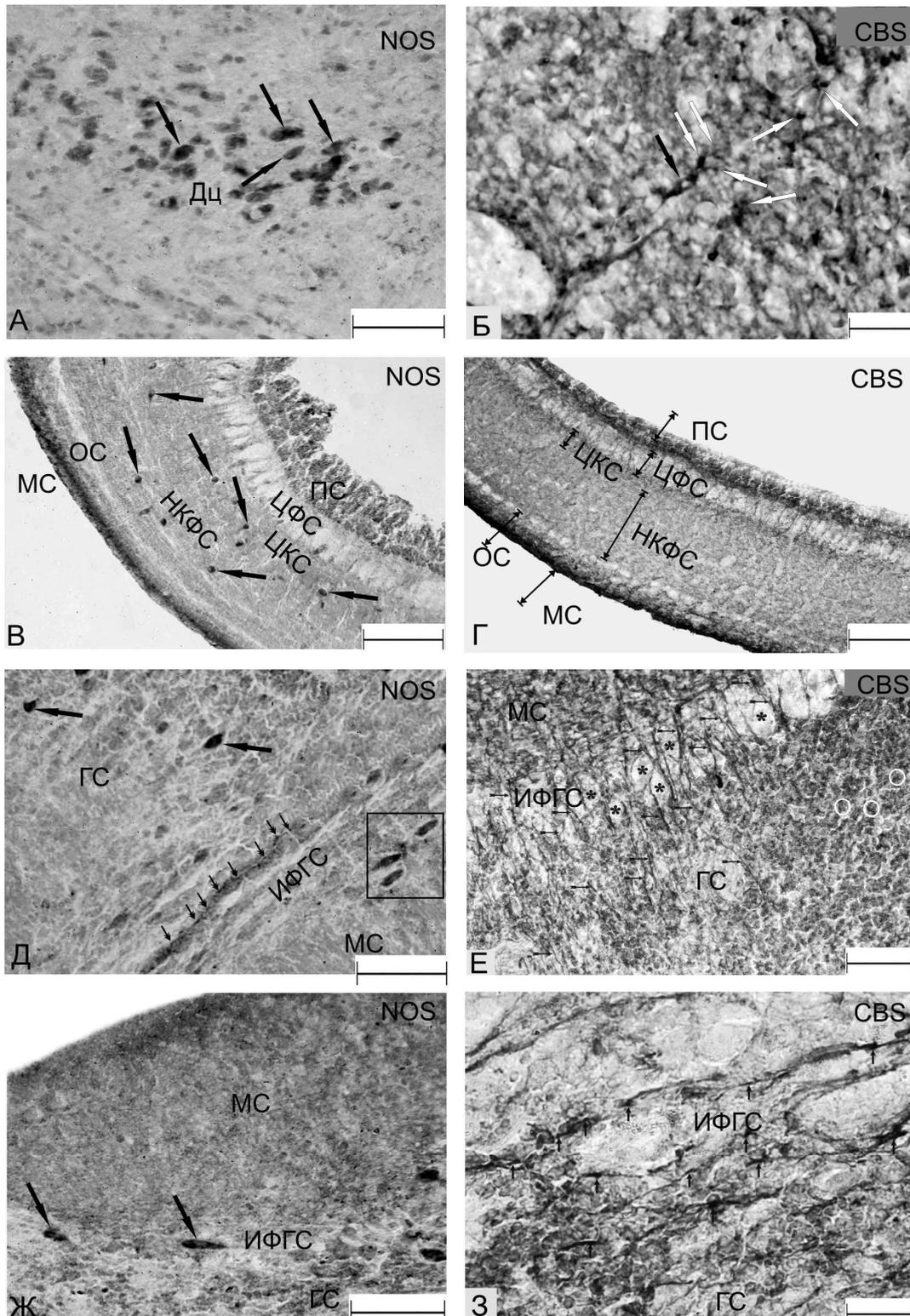
В **конечном мозге** иммунолокализация nNOS и CBS была обнаружена в клетках дорсальной и вентральной областей (рис. А, Б). Морфологические параметры иммунореактивных нейронов приведены в таблице. NOS в конечном мозге симы была выявлена в телах нейронов III-IV типов и не обнаружена в волокнах (таблица). Наиболее крупное скопление NOS-ир клеток дорсальной области выявлено в центральной зоне (Дц, рис. А), в которой расположены интенсивно маркированные тела нейронов, окруженные иммунонегативной областью (рис. А). CBS-иммунолокализация была обнаружена в телах нейронов III-IV типов и волокнах. В ряде случаев маркировались концевые разветвления отростков варикозного типа (рис. Б).

Результаты проведенного исследования показали, что в конечном мозге симы уровень оптической плотности иммуномаркирования CBS и NOS неодинаков (таблица). Распределение CBS и NOS-ир нейронов в различных зонах дорсальной и вентральной областей, а также характер иммуномаркирования клеток и волокон ука-

зывают на то, что NO и H₂S-продуцирующие системы в конечном мозге представляют отдельные не перекрывающиеся между собой нейронные комплексы, выполняющие специализированные функции в работе местных нейронных сетей конечного мозга.

В дорсальной области конечного мозга симы были выявлены биполярные и овальные CBS-ир нейроны среднего и мелкого размера. У биполярных клеток IV типа Вд зоны конечного мозга высокая активность CBS была обнаружена в цитоплазме тела клетки, в волокнах, имеющих варикозные расширения, и их концевых аппаратах. На телах мелких и средних CBS-ир клеток овальной формы были найдены высоко иммуногенные окончания CBS-ир волокон. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в конечном мозге симы H₂S может действовать как классический нейромедиатор и/или нейромодулятор, локализованный в телах клеток и аксосоматических синапсах. В дорсальной и вентральной областях конечного мозга симы (Пушина, 2009) наиболее распространенным нейромедиатором является ГАМК, однако плотность распределения ГАМК-ергических клеток и волокон в дорсальной и вентральной областях неодинакова. ГАМК-ергическая нейротрансмиссия характеризуется высокой изменчивостью синаптических ответов. Показано, что H₂S регулирует различные подтипы ГАМК-рецепторов, локализованные на пре- и постсинаптических позициях (Han et al., 2005). В исследованиях на симе были выявлены CBS-ир волокна варикозного типа, а также аксо-соматические контакты которые могут соответствовать зонам синаптической локализации ГАМК. Возможно, H₂S выступает в качестве модулятора ГАМК-ергической нейротрансмиссии в конечном мозге симы.

Согласно данным литературы (Kawaguchi et al., 1995) в конечном мозге оксид азота выполняет две основные функции. Первая – участие NO в релаксации сосудов путем направленного воздействия на гуанилат-циклазный механизм гладко-мышечных клеток сосудов (Bredt, Snyder, 1992). В ответ на кортикальные, либо паллидарные, стимулы NOS-позитивные клетки могут изменять локальное кровообращение в стриатуме (Kawaguchi et al., 1995). Другая функция оксида азота – модуляция высвобождения стриатарных нейротрансмиттеров. Это осуществляется либо непосредственно, путем взаимодействия с ионными каналами и последующей модификацией НМДА рецепторов, либо опосредованно, при воздействии на окружающие нейроны.



Распределение нитроксидсинтазы и цистатионин β -синтазы в интегративных центрах мозга симы *Onchorhynchus masou*.

Нитроксидсинтаза в конечном мозге (А), тектуме (В), мозжечке (Д, Ж), стрелками показаны NOS-ир нейроны, прямоугольником околнурены эвридендронидные клетки. Цистатионин β -синтаза в конечном мозге (Б), тектуме (Г) и мозжечке (Е, 3), черной стрелкой показан CBS-ир нейрон, белые стрелки показывают синаптические окончания (Б), двунаправленные стрелки показывают границы слоев тектума (Г), * указывают иммунонегативные клетки Пуркинье, мелкие фигурные стрелки CBS-ир волокна, белые овалы околнуривают гломерулоподобные комплексы (Е), стрелками указаны CBS-ир волокна огибающие иммунонегативные клетки Пуркинье (3). Обозначения см. в тексте. Масштаб: А, Д, Е, Ж -100 мкм; Б, 3 - 50 мкм; В, Г - 200 мкм.

Морфометрические характеристики и уровень иммунореактивности NO-ергических и H2S-продуцирующих нейронов ($M \pm m$) интегративных центров головного мозга симы *Onchorhynchus masou*

Область мозга	CBS		nNOS	
	Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al., (1995)*	Интенсивность ИГХ реакции (ЕОП)	Размеры клеток (мкм) и тип по классификации Arevalo et al., (1995)*	Интенсивность ИГХ реакции (ЕОП)
Конечный мозг				
Дд – Дорсальное скопление дорсальной области	7,1±0,7/4,6±0,9 IV 5,3±0,9/3,8±0,7 V	98±8 103,9±4,1	9,9±1,8/7,5±1 IV	90,3±8,5
Дм – Медиальное скопление дорсальной области	–	–	8,1±0,8/5,9±0,8 IV	70±9
Дц – Центральное скопление дорсальной области	20±2,3/6,3±2 III 8,6±1,2/4,9±1 IV 5,7±1,7/3,2±0,6 V	55,8±3,9 58,1±6,1 61,2±4,1	19,5±2,7/11,6±1,7 II	110±4,6
Дл – Латеральное скопление дорсальной области	15,1±2,7/8,3±2 III 12,1±3,4/7,1±1,7 IV	106 106,1±2,8	10,8±1,7/8,3±1 IV	95±2,6
Вд – Дорсальное скопление вентральной области	17±0,6/8,3±0,5 III 10,2±2/6±0,9 IV 5,9±0,5/5,4±0,4 V	129,4±1,9 131,3±5,5 136,6±6,1	18,8±3,3/10,3±2 III 12,6±1,8/9,4±1,8 IV	76,6±9,6 68,2±8
Вл – Латеральное скопление вентральной области	9,1±1,5/5,3±1 IV	132±8,7	–	–
Вв – Вентральное скопление вентральной области	10,9±1,1/7±1,6 IV	137,9±9	11±2/8,6±1,6 IV	99,2±15,6
Оптический тектум				
ЦКС – Центральный клеточный слой	6,6±0,5/4,9±0,9 IV 5,2±0,3/4,4±0,7 V	106,2±0,2 104,9±4,9	40±2,5/12±3,5 II 18±2,8/6,5±0,7 III	78,7±3,7 51,3±11,8
НКФС – Наружный клеточный и фиброзный слой	15,3±3,1/6,2±1 III 8,3±2,3/4,8±0,8 IV 5,3±0,6/4±0,1 V	115,6±4,9 107,2±4,2 111,8±3,6	20,5±3,6/10,2±1,4 III 10±1,4/9±2,8 IV	65,6±22,7 87,4±0,3
ЦФС – Центральный фиброзный слой	–	–	18,6±3,5/7±1 III	59,3±7,6
МОС – Маргинальный и оптический слой	10,5±2,7/6±1,2 IV 5,4±0,7/3,7±0,5 V	125,8±3,9 122,8±1,3	8,3±0,5/4,3±1,5 IV волокна MC	87,3±14,5 61,7±8,3
Перивентрикулярный слой ПС	8,4±0,8/6,2±0,8 IV	94,4±1,8	8,4±1,1/5,2±1,9 IV	79,7±7,3
Мозжечок				
Волокна ИФГС	3,3±1,2	148,7±19,8	1,5±0,3	95,6±7,6
Гранулярные клетки	6,2±0,7/6 ±0,5 IV 4,6±0,5/5±0,5 V	158±5,3 145,8±16,7	20,6±3,3/12,3±1 III 28,5±2,1/11,5±4,9 II	96,5±14 113,6±1,4
Эвридендронидные клетки	–	–	34±5,2/9,3±0,5 II	89,2±2
Гломерулоподобные комплексы	30±4,3/15,4±3,1	145,6±4,5	–	–
Клетки молекулярного слоя	8,7±2,1/20±1,8 IV	88,2±9,8	–	–

* Размеры клеток указаны через черту, римскими цифрами указаны типы клеток по классификации Аревало (1995).

В соответствии с современными представлениями, дорсальная и вентральная области конечного мозга рыб соответствуют паллиальной и субпаллиальной зонам мозга млекопитающих (Wullimann, Rink, 2002). Известно, что паллиальная область телеостей является нейрхимически гетерогенной зоной конечного мозга (Wullimann, Rink, 2002, Обухов и др., 2008). У симы высокая нейрхимическая гетерогенность обнаружена в Вд скоплении (соответствующему стриатарной формации), а также в Вв и Вл скоплениях (соответствующих перегородочной области) (Пущина, 2009). Большинство проекционных нейронов стриатума содержат повышенную концентрацию растворимой гуанилат-циклазы и экспрессируют мРНК растворимой гуанилатциклазы, что под-

тверждает участие таких клеток в качестве потенциальных мишеней для модуляторного воздействия оксида азота, продуцируемого NOS-позитивными клетками (Kawaguchi et al., 1995). В экспериментах *in vivo* аппликация оксида азота в стриатум в растворе Рингера, либо в NO-содержащих смесях, способствовало увеличению высвобождения ацетилхолина, ГАМК и глутамата. При использовании *in vivo* ингибитора NO – N-метил нитроаргинина показано снижение высвобождения дофамина, ГАМК, глутамата, ацетилхолина. Известно, что при участии вышеперечисленных нейромедиаторов формируется базовый уровень продукции NO в конечном мозге, модулирующий высвобождение стриатарных нейротрансмиттеров. Результаты исследования

показывают, что CBS-позитивные и NO-позитивные нейроны могут выполнять специализированные функции в работе местных нейронных сетей конечного мозга.

В **оптическом тектуме** симы были выявлены nNOS-иммунопозитивные нейроны в составе наружного клеточного и фиброзного слоя (НКФС), центрального фиброзного (ЦФС), центрального клеточного (ЦКС) и перивентрикулярного слоев (ПС), nNOS-иммунопозитивные волокна в составе маргинального слоя (МС) (рис. В). Иммунолокализация CBS у симы была выявлена в нейронах IV типа ПС, ЦКС, НКФС, МС и ОС (рис. Г таблица). Наиболее интенсивное иммуномечение CBS было выявлено в нейронах перивентрикулярного слоя и в волокнах маргинального и оптического слоя (рис. Г, таблица). Большинство NOS-ир нейронов тектума симы расположено в НКФС и ЦКС. NO-продуцирующие нейроны в этих слоях представляют проекционные клетки либо вставочные нейроны, осуществляющие вертикальные и горизонтальные связи в тектуме симы (Qyan et al., 2000). В ЦКС выявлены NOS-ир интернейроны веретеновидной формы, играющие роль модуляторов при осуществлении анализа формы предмета и его передвижения (Holmqvist et al., 2004). Отростки таких клеток направляются в противоположные стороны, связывая нижние и верхние слои тектума. В НКФС NOS выявлена в проекционных пирамидоподобных нейронах III и IV типов, дендриты которых получают через систему проходящих здесь волокон разнообразную афферентную сигнализацию (из сетчатки, мозжечка, промежуточного мозга, клеток других слоев самого тектума). В волокнах маргинального слоя была выявлена высокая активность CBS и NOS. Большинство волокон, образующих маргинальный слой, представляют собой афференты мозжечка, а оптический слой образован афферентами поступающими от сетчатки (Arevalo et al., 1995; Qyan et al., 2000). Таким образом, иммунолокализация CBS в тектуме симы обнаружена в структурах, осуществляющих связь между важнейшим сенсорным анализатором (сетчатка), центром координации двигательной активности (мозжечок) и тектумом. Перивентрикулярный слой наиболее богат клеточными элементами, граничит с полостью среднего мозга. У симы в перивентрикулярном слое присутствовали как CBS-ир, так и NOS-ир клетки (рис. В, Г). В перивентрикулярном слое, на границе эпендимной выстилки мозгового желудочка и стенки среднего мозга, располагается

слой матричных клеток, в котором идут процессы активного деления камбиальных клеток, начинается миграция молодых нейробластов в толщу тектума и формируются вышележащие слои (Обухов и др., 2008). Наличие NO и H₂S-продуцирующих элементов в перивентрикулярном слое тектума указывает на возможное участие сероводорода и оксида азота в морфогенезе этого отдела мозга.

В **мозжечке** симы CBS-иммунолокализация была выявлена в волокнах, пронизывающих инфраганглионарное сплетение (ИФГС), клетках IV и V типов молекулярного (МС) и гранулярного (ГС) слоев (рис. Е). В гранулярном слое были найдены интенсивно маркированные CBS-ир мелкие клетки V типа и более крупные NOS-ир нейроны II и III типов (рис. Д, таблица). Крупные NOS-ир клетки гранулярного слоя отнесены нами к гранулярным клеткам Гольджи. Чаще всего CBS-ир клетки гранулярного слоя формировали удлиненные гломерулоподобные комплексы, окруженные иммунонегативной зоной (рис. Е). В молекулярном слое мозжечка были выявлены мелкие IV-V типов CBS-ир клетки. Клетки молекулярного слоя имели высокий уровень активности CBS (таблица). Клетки Пуркинье у симы CBS-иммунонегативны, но окружены CBS-позитивными волокнами – гладкими либо имеющими одиночные концевые булавовидные утолщения (рис. З). Здесь же были выявлены немногочисленные тонкие NOS-позитивные волокна с варикозными расширениями по ходу и малоразветвленными окончаниями (рис. Д). В дорсо-латеральной зоне инфраганглионарного сплетения мозжечка были идентифицированы NOS-позитивные эвридендронидные нейроны (рис. Д, Ж).

У симы выявлены CBS-ир волокна, пронизывающие ганглиозный слой мозжечка, являющиеся, предположительно, аналогами глутаматергических лиановидных волокон млекопитающих (Chan-Palay, Palay 1971). Известно, что H₂S избирательно стимулирует токи, опосредованные глутаматными НМДА-рецепторами (Qu et al., 2008). Механизмы, лежащие в основе того, как H₂S потенцирует функции НМДА-рецепторов, остаются неизученными, хотя один из них, возможно, связан с окислительно-восстановительной модуляцией тиоловых групп (Qu et al., 2008). Наличие большого количества волокон варикозного типа и CBS-ир окончаний в инфраганглионарном сплетении мозжечка, возможно, указывает на синаптический способ высвобождения H₂S в этой области мозга симы.

В гранулярном слое мозжечка симы были выявлены NOS-ир клетки Гольджи, а также CBS-ир структуры, напоминающие гломерулоподобные комплексы в мозжечке млекопитающих. Наиболее важными медиаторами гломерул млекопитающих являются глутамат и ГАМК (Hamann et al., 2002). При электроимпульсной стимуляции данные медиаторы поступают внутрь гломерул и путем свободной диффузии достигают своих мишеней (Калиниченко, Мотавкин, 2005). H₂S в гранулярном слое симы может выступать в качестве модулятора ГАМК-ергических синапсов, как это было показано на млекопитающих (Abe, Kimura, 1996) Распределение CBS в гранулярном слое мозжечка, а также наличие высокой плотности распределения тел CBS-ир гранулярных клеток, при отсутствии CBS-ир волокон варикозного типа и окончаний в гранулярном слое мозжечка исследованных рыб, предполагает несинаптический (паракринный) способ высвобождения H₂S и определяет его действие в качестве объемного нейротрансмиттера.

Обнаружение nNOS в эвридендронидных клетках симы подтверждает данные (Пушина, Вараксин, 2001) о гистохимическом маркировании NADPH-d в нейронах этого типа у рыб. У тетрапод эфферентные системы мозжечка выходят в основном из его собственных ядер. В мозжечке телеостей собственные ядра отсутствуют, но вместо церебеллярных эфферентных нейронов у рыб имеются так называемые эвридендронидные клетки (ЭДК), расположенные под слоем клеток Пур-

кинье. Исследования показали (Ikenaga et al., 2006), что большинство ЭДК представляют собой аспартатергические нейроны, получающие ГАМК-ергические импульсы от клеток Пуркинье. Известно, что ЭДК получают входящие сигналы от параллельных волокон и клеток Пуркинье, но не имеют входной сигнализации от лазающих волокон (Ikenaga et al., 2006). Такие взаимоотношения между ЭДК и клетками Пуркинье сходны с таковыми, установленными для клеток Пуркинье и ядер мозжечка млекопитающих и позволяют рассматривать ЭДК рыб в качестве функциональных аналогов мозжечковых ядер млекопитающих. ЭДК тела мозжечка и медиальной части заслонки проецируются во множество областей: от промежуточного до каудальной части продолговатого мозга. Некоторые ЭДК заслонки имеют проекции в теленцефалон. Идентифицированные у симы тонкие NOS-ир волокна могут быть аксонами эвридендронидных нейронов. Таким образом, оксид азота, локализуясь в проекционных ЭДК, выступает в качестве модулятора аспартатергических сигналов, поступающих в составе эфферентных волокон к различным участкам мозга симы.

Установленное нами распределение CBS и NOS-ир нейронов и волокон в интегративных центрах мозга симы позволяет предполагать, что NO и H₂S-продуцирующие системы представляют отдельные, не перекрывающиеся между собой, нейронные комплексы, выполняющие специализированные функции в работе местных нейронных сетей.

Литература

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 1996. V. 16. P. 1066–1071. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utils/fref.fcgi?PrId=3051&itool=AbstractPlus-def&uid=8558235&db=pubmed&url=http://www.jneurosci.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=8558235>
- Arevalo R., Alonso J.R., Garcia-Ojeda E., Brinón J.G., Crespo C., Aijón J. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the tench (*Tinca tinca* L., 1758). *J. Comp. Neurol.* 1995. V. 352. P. 398–420.
- Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. 1992. *Neuron.* V. 8. P. 3–11.
- Chan-Palay V., Palay S.L. The synapses en marron between Golgi II neurons and mossy fibers in the rats cerebellar cortex. *Ztschr. Anat. Entwicklungsgesch.* 1971. Bd. 133. S. 274–287.
- Hamann M., Rossi D.J., Attwell D. Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron.* 2002. V. 33. P. 625–633.
- Han Y., Qin J., Chang X., Yang Z., Bu D., Du J. Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. *Neurosci. Res.* 2005. V. 53. P. 216–219.
- Holmqvist B., T. Östholm, P. Alm. Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. 1994. *Neurosci. Lett.* V. 171. P. 205–208.
- Holmqvist, B., Goksoyr, A. and Qyan, A., Distributional expression of brain neuronal nitric oxide synthase mRNA during developmental life stages of Atlantic salmon, *Soc. Neurosci. Abst.* 1998. V. 24. P. 21514.
- Ikenaga T., Yoshida M., Uematsu K. Cerebellar efferent neurons in teleost fish. *Cerebellum.* 2006. V. 5. P. 268–274.
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., Emson P.C. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 1995. V. 18. P. 527–535.
- Olson K.R., Donald J.A. Nervous control of circulation – The role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S. *Acta Histochem.* 2009. V. 111. P. 244–256.
- Qu K., Lee S.W., Bian J.S. et al. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem. Int.* 2008. V. 52. P. 155–165.

Qyan, A.-M., Nilsen, F., Goksoyr, A. and Holmqvist, B., Partial cloning of constitutive and inducible nitric oxide synthases and detailed neuronal expression of NOS mRNA in the cerebellum and optic tectum of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 2000, V. 78. P. 38–49.

Wullimann M.F. The central nervous system. *Physiology of fishes*. Boca Raton., New-York: CRS Press. 1997. P. 245–282.

Wullimann M.F., Rink E. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull.* 2002, V. 57. P. 363–370.

Калиниченко С. Г., Мотавкин П. А. Кора мозжечка. М.: Наука, 2005. 319 с.

Мотавкин П. А. Введение в нейробиологию. 2003. Владивосток. Медицина ДВ. 251 с.

Обухов Д. К., Обухова Е. В., Пущина Е. В. Конечный мозг – как интегративный центр нервной системы рыб. Проблемы регуляции висцеральных функций. Кн. 1. Минск: РИВШ, 2008. С. 122–126.

Пущина Е. В. Распределение ГАМК-ергических нейронов в конечном мозге тихоокеанского лосося *Oncorhynchus masu* Актуальные вопр. гуманитарн. и естеств. наук. 2009. № 10. С. 30–39.

Пущина Е. В., Варакин А. А. Аргирофильные и нитроксидергические биполярные нейроны в мозжечке опистоцентра *Pholidapus dibowskii*. 2001. Ж. эволюц. биох. и физиол. 2001. Т. 37, № 5. С. 437–441.

NO AND H₂S PRODUCING SYSTEMS IN SALMON *ONCHORHYNCHUS MASOU* TELENCEPHALIC AREAS

E.V. Pushchina¹, D.K. Obukhov²

¹ *Institute of Marine Biology Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, e-mail: pushchina@mail.ru;*

² *Department Cytology and Histology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*

The revealed distribution of CBS and NOS-ir neurons and fibers in different parts of dorsal and ventral telencephalic areas allow to suppose, that NO and H₂S-producing systems in *Onchorhynchus masou* telencephalon present discrete, not overlapping between themselves, neuronal complexes, which carry out special functions in local neural network. CBS immunolocalisation in optical tectum of *Onchorhynchus masou* was revealed in layers, which are connected with important sensory analyzer (retina), the motor activity centre (cerebellum) and optical tectum. The

presence of NO and H₂S-producing elements in periventricular tectal layer mean possible participation of hydrogen sulfide and nitric oxide in tectal morphogenesis. In ventral telencephalic area and infragranular cerebellar plexus of *Onchorhynchus masou* the CBS-ir fibers with varicosities and high immunoreactive endings were revealed. These findings, possibly, indicate on synaptic release of H₂S in this area of brain. It seems that, in the *Onchorhynchus masou* brain the methods of NO and H₂S releasing has impact on the neuromodulatory effects character.

НЕОБЫЧНЫЕ ДЛИННЫЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЦЕПИ ФОСФОЛИПИДОВ: ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ (МЕТОД МОНТЕ-КАРЛО)

А. Л. Рабинович, П. О. Рипатти

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: rabinov@krc.karelia.ru

Введение

Мембранные системы являются сложными макромолекулярными комплексами, традиционно привлекающими к себе огромное внимание исследователей. Один из источников такого интереса – это способность отдельных компонентов мембранных систем (большинство из которых – амфифильные молекулы) к самопроизвольной организации. Центральный вопрос – взаимосвязь между химическим строением исходных молекулярных компонентов и физическими свойствами итоговых структур в разных условиях; большую важность представляют также вопросы о функциональной роли того или иного компонента системы. В течение последних лет количество экспериментальных и теоретических работ по исследованию организации, архитектуры мембран неуклонно возрастает (см., напр., Le Guyader et al., 2007; Pike, 2009; Marrink et al., 2009).

В биологической мембране обычно сосуществуют десятки, сотни типов липидных молекул (они образуют ее основу), имеются также белки, углеводы, стерины и другие молекулы, вовлеченные в разнообразные клеточные процессы. Липидные молекулы различаются по химическому строению головных групп и/или углеводородных цепей (цепей остатков жирных кислот, ЖК). В течение многих лет широко и интенсивно проводятся исследования свойств биомембранных систем. Вместе с тем следует признать, что имеющиеся на сегодня экспериментальные данные об этих свойствах остаются фрагментарными; некоторым оправданием может служить огромное разнообразие мембранных систем. В то же время общепризнанным стало утверждение о том, что ключевое значение для функцио-

нирования биомембран имеют их особые компоненты: ненасыщенные и полиненасыщенные цепи липидных молекул (см., напр., Stillwell, Wassall, 2003; Valentine, Valentine, 2004; Stillwell, 2008). Наиболее детальную информацию о молекулярной системе сегодня можно извлечь даже не экспериментальными методами (хотя таковые представляются чрезвычайно важными), а с помощью компьютерной имитации соответствующей полноатомной модели системы. Это осуществляется методом Монте-Карло (МК) и/или молекулярной динамики (МД) (Marrink et al., 2009; Pandit et al., 2004; Feller, 2008; van Gunsteren et al., 2008; Рабинович, Иванов, 2009). Некоторые данные о свойствах уже получены этими методами и для ненасыщенных и полиненасыщенных углеводородных компонентов липидов. В частности, методом МК за последние годы был рассчитан ряд характеристик углеводородных цепей различной степени ненасыщенности (Rabinovich, Ripatti, 2001; Rabinovich, Ripatti, 2002; Рабинович, Рипатти, 2002; Рабинович, Рипатти, 2000; Рабинович, Рипатти, 2000а; Рабинович, Рипатти, 1999; Рабинович, Рипатти, 1999а; Рабинович, 2008, 2009).

Химическое строение наиболее типичных ненасыщенных углеводородных цепей липидов биомембран характеризуется тем, что все их двойные связи С=С являются метиленпрерывающимися, т.е. между каждой парой двойных связей расположена только одна группа СН₂. Ниже для обозначения химического строения таких цепей будет использовано сокращение N:k(n-j)cis. Здесь N – общее количество атомов углерода; k – количество метиленпрерывающихся двойных связей; j – количество атомов углерода до ближайшей двойной связи, считая от концевой группы СН₃ цепи (на это указывает

наличие символа n ; иногда вместо $(n-j)$ используется обозначение ω_j); *cis* – конфигурация двойных связей. Подавляющее большинство «обычных» цепей ЖК в биомембранах имеет длину $N = 12–22$ (наиболее часто $N = 16–22$) и количество двойных связей $k = 1–6$.

Установлено, однако, что в некоторых биомембранах содержатся также цепи «необычные», выделяющиеся по длине N (а иногда и по количеству двойных связей k) из общего ряда цепей. Например, более 30 лет назад были обнаружены цепи $30:4(n-6)cis$ и $30:5(n-3)cis$ в составе ЖК морских губок *Cliona celata* (Litchfield et al., 1979); в других видах губок идентифицированы цепи с $N = 26, 28, 30$ и $k = 2, 3$ (Litchfield et al., 1979). О наличии в разных видах губок необычных ЖК с различным количеством и расположением двойных связей, а также с четным и нечетным N , сообщалось неоднократно (Joseph, 1979; Řezanka, 1989; Djerassi, Lam, 1991; Řezanka, Sigler, 2009). Далее, в клетках морских микроводорослей динофлагеллят *Prorocentrum mexicanum*, *P. micans*, *Scrippsiella sp.*, *Symbiodinium microadriaticum*, *Gymnodinium sp.*, *G. sanguineum*, *Fragilidium sp.* идентифицированы октакозагептаеновые $28:7(n-6)cis$ и октакозаоктаеновые $28:8(n-3)cis$ цепи ЖК (Mansour et al., 1999). Они составляли ~2% от общего количества ЖК в этих клетках. Интересным представляется то обстоятельство, что цепи с «промежуточными» длинами цепей $N = 22–27$ при этом не обнаружены (Mansour et al., 1999). Наличие цепи $28:8(n-3)cis$ зафиксировано также у *Cryptocodinium cohnii* (Van Pelt et al., 1999). Набор длинноцепочечных ацилов вплоть до $36:8(n-3)cis$ идентифицирован в клетках динофлагеллят *Amphidinium carterae* (Řezanka et al., 2008; Řezanka et al., 2008a). Найдено также несколько десятков типов цепей с нечетным значением N , хотя и в малых концентрациях, – меньших еще на порядок (Řezanka et al., 2008a). В ряде работ приведены аналогичные данные и для других клеток (Řezanka, Sigler, 2009). Из тканей трех видов пресноводных ракообразных, *Bathynella natans*, *B. baicalensis*, *Baicalobathynella magna*, было выделено более 50 типов подобных необычно длинных жирнокислотных цепей, в том числе, например, $26:5(n-6)cis$, $28:7(n-6)cis$, $30:7(n-3)cis$ и $40:7(n-6)cis$ (Řezanka, 2000). В других водных организмах тоже обнаружены необычные цепи ацилов (Řezanka, Sigler, 2009).

Очень важно отметить, что к настоящему времени подобные необычные цепи уже идентифицированы в составе липидных молекул мембран не только водных организмов. Иными сло-

вами, фактически речь идет о явлении общебиологического значения. Так, в молекулах фосфолипидов, эфиров холестерина и триглицеридов половых желез млекопитающих (мышей и крыс) отмечено (Furland et al., 2007; Zanetti et al., 2007) наличие $(n-6)$ -тетра- и $(n-6)$ -пентаеновых ЖК цепей длиной 24–32 атома углерода (помимо обычных с $N = 18–22$), среди которых идентифицированы цепи $24:5(n-6)cis$, $28:5(n-6)cis$, $30:5(n-6)cis$, $28:4(n-6)cis$. Ранее в молекулах фосфатидилхолинов (ФХ) некоторых клеток (нейтрофильных лейкоцитов человека) были обнаружены цепи $24:4(n-6)cis$, $28:4(n-6)cis$, $30:4(n-6)cis$, $32:4(n-6)cis$, $34:6(n-3)cis$ (Hardy et al., 1995). Имеются данные о наличии полиненасыщенных цепей типа $N:4(n-6)cis$, $N:5(n-6)cis$, $N:5(n-3)cis$, $N:6(n-3)cis$ с четным количеством атомов углерода $N = 24, 26, 28, \dots, 38$ в молекулах ФХ тканей мозга животных (Robinson et al., 1990). Более того, экспериментально установлена следующая закономерность (Robinson et al., 1990): в липидах мозга развивающихся животных обнаруживаются лишь цепи типа $N:5(n-6)cis$ и $N:6(n-3)cis$, тогда как у взрослых – только цепи типа $N:4(n-6)cis$ и $N:5(n-3)cis$.

В литературе отмечен также факт, что такие необычно длинные углеводородные цепи являются компонентами молекул ФХ исключительно необычных типов. Необычность последних состоит в том, что длинные цепи встречаются в этих липидах в положении *sn-1* глицеринового основания (Robinson et al., 1990); еще раньше (Aveldaño, 1987; Aveldaño, Sprecher, 1987) был выявлен аналогичный факт для молекул ФХ, обнаруженных в сетчатке глаз. В молекулах ФХ «обычных» типов положение *sn-1*, как правило, занято насыщенной углеводородной цепью (например, $16:0$, $18:0$). При этом в положении *sn-2* молекул ФХ как обычных, так и необычных типов, расположены насыщенные, мононенасыщенные или полиненасыщенные цепи с длиной цепи $N < 24$ (Robinson et al., 1990).

Наличие молекул ФХ с тетра- и пентаеновыми цепями $N:4(n-6)cis$, $N:5(n-6)cis$, гексаеновыми цепями $N:6(n-3)cis$ длиной $N = 32–38$ в тканях мозга выявлено и в работе (Poulos et al., 1988). При этом было также выявлено, что в случае недостатка пероксида в мозге, – болезнь Цельвегера (Poulos et al., 1988), концентрация аналогичных фосфолипидов оказывается выше по сравнению с таковой у нормального, здорового мозга, но ЖК состав становится иным: для нормального состояния мозга типичны тетра- и пентаеновые цепи ЖК, а при недос-

татке пероксисом – пента- и гексаеновые. По сути, основное отличие больного мозга от здорового состоит в том, что в случае недостатка пероксисом присутствуют гексаеновые цепи вместо тетраеновых (Poulos et al., 1988).

В клетках зародышей млекопитающих (крыс) обнаружены (n-6)-тетра- и пентаеновые цепи длиной $N = 24-34$ (составляющие до 5% общего состава ЖК), в том числе и с нечетным их числом: 25, 27, 29, 31 (Furland et al., 2007). Такие цепи являются доминирующими компонентами, достигающими 70%, сфингомиелина и керамида половых клеток (Furland et al., 2007a).

Как уже упоминалось, необычные ЖК цепи были давно обнаружены в сетчатке глаз. А именно, в молекулах ФХ сетчатки глаз позвоночных, – изучались бык, кролик, крыса, цыпленок (Aveldaño, 1987; Aveldaño, Sprecher, 1987; Rotstein, Aveldaño, 1988; Aveldaño, 1988), содержится полный набор ЖК длиной $N = 24-36$. Это (n-6)-тетраены и (n-3)-гексаены; идентифицированы и пентаены, среди которых встречаются преимущественно цепи (n-3), хотя имеются и цепи (n-6). Необычные ЖК цепи входят в состав исключительно диполиненасыщенных молекул ФХ, эти цепи расположены в *sn-1* положении, что согласуется с аналогичными данными в работах (Robinson et al., 1990; Poulos et al., 1988), тогда как в положении *sn-2* молекул ФХ находится преимущественно цепь 22:6(n-3)*cis*. Было отмечено (Aveldaño, 1988), что такие длинные цепи содержатся примерно в 25% молекул ФХ из дисков мембран фоторецепторов; при этом примерно в 30% фосфолипидов (это 31% молекул ФХ, 20% фосфатидилэтаноламина и 52% фосфатидилсерина) обе цепи являются полиненасыщенными. Далее, при проведении экстракции гексаном мембран фоторецепторов было установлено, что во фракции липидов, связанных с родопсином, резко повышено содержание липидов с обычными и необычными полиненасыщенными цепями (Aveldaño, 1988).

Однотипность строения необычных полиненасыщенных липидных молекул мембран совершенно разных объектов может свидетельствовать о том, что их функции в разных биологических мембранах тоже сходны. Некоторые предположения на этот счет в литературе уже имеются. В частности, в работах (Aveldaño, 1987; Aveldaño, 1988) отмечается, что

(i) полиненасыщенные длинноцепочечные ЖК компоненты молекул ФХ в сетчатке, возможно, необходимы, чтобы способствовать фоторецепторным белкам мембраны, – главным об-

разом, родопсину, если, например, его альфа-спиральные сегменты частично окружены подобными ФХ (Aveldaño, 1988), принимать определенные функциональные конформации, и, следовательно, играют важную роль в осуществлении процесса зрения;

(ii) возможно, соответствующий тип молекул фосфолипидов в мозге требуется также для правильной ориентации характерных мембранных белков;

(iii) молекулы ФХ мозга, содержащие длинные полиненасыщенные цепи и/или их полиненасыщенные продукты распада (неэтерифицированные ЖК, лизофосфатидилхолин и диацилглицерин) могут быть метаболически активными соединениями, важными с точки зрения регулирования клеточных процессов.

Имеются также предположения о том, что функциональная роль ФХ с длинными полиненасыщенными цепями может быть наиболее существенной лишь на отдельной, специфической стадии развития мозга.

Факт локализации необычных липидных цепей в жизненно важных тканях свидетельствует, очевидно, о том, что роль таких цепей физиологически значима, в чем бы она ни состояла (подобный вывод отмечен и в некоторых работах (Robinson et al., 1990; Poulos et al., 1988). Иными словами, такие цепи по ряду причин необходимы для функционирования тканей. В сравнительно недавней работе (McMahon et al., 2007) также получены данные, которые явно поддерживают такой вывод. А именно, когда в молекулах ФХ сетчатки глаз мышей наблюдался (из-за мутации гена элонгазы Elov14) дефицит ЖК с длинными цепями $N = 32-36$, то возникало специфическое заболевание («болезнь Старгардта-3»). Это позволило авторам работы (McMahon et al., 2007) предположить, что дефицит подобных цепей, возможно, приводит к аналогичной патологии и у человека.

С другой стороны, необычные полиненасыщенные цепи ЖК являются физиологически значимыми, а их содержание в общем составе ЖК при этом очень мало: $\leq 1\%$ (Robinson et al., 1990; Poulos et al., 1988), $\sim 2\%$ (Mansour et al., 1999), $\leq 5\%$ (Furland et al., 2007). Следовательно, их физиологическая значимость проявляется потому, что они оказывают влияние на некоторые ключевые компоненты биологических мембран, – такими являются, например, белки. Поэтому приведенные выше предположения о функциях необычных полиненасыщенных ЖК (Aveldaño, 1987; Aveldaño, 1988) представляют

ся вполне логичными, хотя анализ каких-то свойств таких цепей для обоснования их роли в работах (Aveldaño, 1987; Aveldaño, 1988) не проводился.

Вместе с тем, возможные функции обычных полиненасыщенных ЖК цепей изучаются уже в течение длительного времени. В частности, были выдвинуты предположения о причинах преимущественного их взаимодействия с белками; предположения основаны на результатах расчета свойств полиненасыщенных ЖК цепей с $N = 12-22$ с помощью имитационного моделирования методом МК (Рабинович и др., 1985; Дашевский, Рабинович, 1986; Рабинович и др., 1986; Рабинович, Рипатти, 1990, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004). Ниже, при обсуждении результатов, мы вернемся к обсуждению этих вопросов.

Обращает на себя внимание и тот факт, что хотя длина N необычных полиненасыщенных цепей превышает длину обычных полиненасыщенных цепей липидов весьма существенно (примерно в 2 раза), общее количество двойных связей k и их местоположение j в необычных цепях в подавляющем большинстве случаев остаются такими же, как и в цепях обычных ($k \leq 6$; $j = 3, 6$). Следовательно, либо (а) свойства, *необходимые* необычным полиненасыщенным цепям для выполнения определенных функций в биомембране, достигаются именно по причине наличия в них дополнительного длинного насыщенного участка цепи и локализации этих цепей в положении *sn-1*, либо (б) наличие такого протяженного насыщенного участка полиненасыщенной цепи в *sn-1*-положении оказывается *уже достаточным* для выполнения ею надлежащих функций, хотя, быть может, какие-то дополнительные модификации строения цепи обеспечили бы еще более успешное выполнение ею этих функций. На данную ситуацию можно посмотреть и с другой стороны («со стороны белков»): (в) присутствие необычных липидных молекул вблизи белков, возможно, является *достаточным* условием для функционирования последних, хотя, возможно, существуют молекулы и других типов с аналогичными или еще лучшими свойствами; (г) присутствие таких липидов является *необходимым* фактором функционирования белков, – ср. с выводом работы (McMahon et al., 2007).

Однако фактически оба приведенных выше взгляда – это две стороны одной медали: липид-белкового взаимодействия. Учитывая, что стру-

ктурные особенности липидов и белков прошли продолжительный этап эволюции, который не мог протекать у них независимо друг от друга, наиболее вероятной в итоге является ситуация, при которой оба молекулярных компонента мембран соответствуют друг другу (т.е. комплементарны) и, следовательно, в утверждениях выше условия *необходимости* и *достаточности* соблюдаются одновременно.

Подчеркнем еще раз, что затронутые представления о роли необычных цепей являются лишь предположительными. Обосновать или отвергнуть их, прояснить ситуацию можно было бы, сравнивая между собой физические свойства достаточно широкой совокупности таких цепей. Однако данные о свойствах необычных ЖК цепей (встречающихся к тому же в малых количествах) на сегодня в литературе чрезвычайно скудны вследствие трудностей по выделению и идентификации таких цепей. Можно отметить работу по экспериментальному изучению температурного поведения липосом, образованных несколькими молекулами необычных ФХ (Antollini, Aveldaño, 2002). Один из обзоров степени распространенности в природе необычных ЖК цепей разного строения представлен в недавней работе (Řezanka, Sigler, 2009); основное внимание в обзоре (Řezanka, Sigler, 2009) уделено цепям с нечетным N . В целом можно сделать вывод, что необычно длинные цепи ЖК, если учитывать не только полиненасыщенные, но и насыщенные и мононенасыщенные, обнаружены практически во всех объектах, от бактерий до человека (Řezanka, Sigler, 2009).

В настоящее время широко обсуждается факт «доменности» структуры мембранных систем (Pike, 2009; Edidin, 2003; Shaikh, Edidin, 2006; de Almeida et al., 2007; Schultz, Levin, 2008; Risselada, Marrink, 2008; Yethiraj, Weisshaar, 2007). Возможно, полиненасыщенные липиды с необычными «длинноцепочечными» компонентами, как и с цепями обычных длин, – $22:6(n-3)cis$, $22:5(n-6)cis$, $20:4(n-6)cis$, могут образовывать специфические типы доменов со специальным составом компонентов (Wassall, Stillwell, 2008; Soni et al., 2008; Bakht, Pathak, 2007). С другой стороны, например, в мембране фотосинтезирующих пурпурных бактерий подавляющее большинство липидов связано с бактериородопсином (Jost et al., 1978), так что бислоя (или доменов бислоя) в традиционном смысле в этой мембране просто не существует. Это вполне может относиться, в той или иной степени, и к другим специфическим био-

мембранам, например, к дискам фоторецепторных клеток (Aveldaño, 1988), – информации на этот счет на сегодня явно недостаточно.

Таким образом, перечисленные здесь факты наличия необычных липидных молекул биомембран с длинными цепями ЖК (представляющие на самом деле лишь малую часть биохимических данных, имеющихся на сегодня) порождают множество вопросов. В числе первых – вопрос о свойствах необычных молекул. Экспериментальные данные о физических, химических или физико-химических свойствах необычных цепей, как упоминалось, почти полностью отсутствуют. В этих условиях для извлечения исковой информации целесообразно использовать весьма мощное средство – имитационное моделирование («компьютерный эксперимент»).

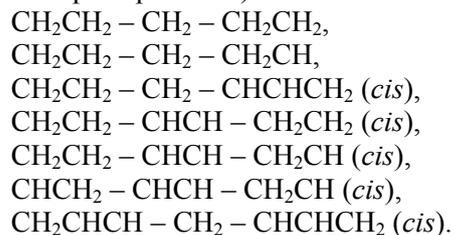
В настоящей работе проведена компьютерная имитация конформационного поведения одной из типичных совокупностей необычных полиненасыщенных ЖК цепей; использован метод МК. По итогам компьютерного моделирования рассчитаны средние значения размеров, гибкости и других характеристик данной группы цепей. Анализ этих свойств, а также сравнение с соответствующими свойствами обычных полиненасыщенных липидных цепей позволили конкретизировать предположения о возможной функциональной роли таких цепей в специфических биологических мембранах.

Метод моделирования и расчета свойств жирнокислотных цепей

Проведено генерирование ансамблей конформаций различных неразветвленных цепных углеводородных олигомеров методом МК. Для этого была использована ранее разработанная модель, детали которой изложены в работах (Дашевский, Рабинович, 1983; Rabinovich, 1991). Данный подход неоднократно применялся для имитации и расчета свойств углеводородных цепей различного химического строения (Rabinovich, Ripatti, 2001; Рабинович, Рипатти, 2002; Рабинович, Рипатти, 1999а). При генерировании конформаций рассматриваемой цепной молекулы на компьютере в рамках этой модели все углы внутреннего вращения вокруг простых связей основной цепи молекулы, в отличие от поворотно-изомерного приближения (Флори, 1971) изменяются непрерывно в диапазоне от 0 до 360°. Величины валентных связей и валентных углов цепи при имитации были фиксированными, отвечающими экспери-

ментальным структурным данным. Цепи при имитации «конструировали» последовательно, по молекулярным фрагментам, содержащим по 5–7 углеродных атомов. Эти фрагменты точно передают детали химического строения. Для образования цепи заданной структуры выбирается соответствующий набор молекулярных фрагментов.

Для пояснения методики приведем схемы нескольких фрагментов. В каждой схеме ниже выделены две простые связи, вращения вокруг которых являются взаимозависимыми; вращения вокруг двойных связей C=C не рассматривались (угол строго равен 0°):



Для фрагментов, в которых есть одна или две двойных связи, в скобках указана конфигурация последних. При вычислении энергии каждого фрагмента была учтена энергия невалентных взаимодействий, торсионная энергия и электростатическая энергия (Дашевский, Рабинович, 1983; Rabinovich, 1991).

В итоге были изучены свойства необычных полиненасыщенных цепей следующего строения: N:4(n-6)cis, N:4(n-3)cis, N:5(n-6)cis, N:5(n-3)cis, N:6(n-6)cis, N:6(n-3)cis. Была избрана совокупность цепей с четным количеством атомов углерода, N = 24, 26, 28, ..., 38. Для расчета искоемых средних характеристик генерировали на компьютере по 300000–1000000 конформаций цепи каждого типа в невозмущенном (Флори, 1971) состоянии при температуре 25 °C (298 K). В идентичных условиях была смоделирована также совокупность более коротких ненасыщенных цепей, являющихся фрагментами вышеуказанных необычных цепей: 15:4(n-3)cis, 18:4(n-3)cis, 18:5(n-3)cis, 21:5(n-3)cis, 21:6(n-3)cis, а также насыщенных цепей разных длин: 8:0, 9:0, 10:0, ..., 22:0. Для двух цепей, 18:0 и 18:5(n-3)cis, была дополнительно проведена имитация при температурах 5 °C и 130 °C (278 K и 403 K) с объемами выборок в 1500000 конформаций. По результатам компьютерного моделирования были рассчитаны средние расстояния $\langle h_0 \rangle$ и квадраты расстояний $\langle h_0^2 \rangle$ между концевыми атомами углерода каждой из молекул, а также характеристики их равновесной (термодинамической) гибкости.

Отметим, что в качестве меры равновесной гибкости молекул цепного строения, как известно по литературе (Флори, 1971; Волькенштейн, 1959; Бирштейн, Птицын, 1964; Дашевский, 1987; Готлиб и др., 1986; Гросберг, Хохлов, 1989), использовались разные характеристики:

– значение персистентной длины a , которое вычисляется из соотношения

$$\langle h_0^2 \rangle = 2La \{1 - (a/L)[1 - \exp(-L/a)]\},$$

где $\langle h_0^2 \rangle$ – среднее значение квадрата расстояния между концевыми атомами рассматриваемой цепи в невозмущенном состоянии, L – контурная длина цепи (Флори, 1971), угловые скобки \langle, \rangle здесь и ниже означают усреднение по ансамблю конформаций;

– величина статистического сегмента Куна;

– величина относительной заторможенности σ ,

$$\sigma = (\langle h_0^2 \rangle / \langle h_{cb}^2 \rangle)^{1/2},$$

где $\langle h_{cb}^2 \rangle$ – средний квадрат расстояния между концевыми атомами гипотетической цепи, у которой внутренние вращения свободны, но валентные связи и валентные углы фиксированы; определение $\langle h_0^2 \rangle$ приведено выше;

– величина характеристического отношения

$$C_n = \langle h_0^2 \rangle / nl^2,$$

где n – количество связей цепи, l^2 – средний квадрат длины связи (nl^2 в знаменателе формулы – это средний квадрат расстояния между концевыми атомами гипотетической свободно-сочлененной цепи);

– величина отношений $\langle h_0^2 \rangle / L^2$ и $(\langle h_0^2 \rangle)^{1/2} / L$;

– величина отношения $\langle h_0 \rangle / L$; эта величина использована для сравнения равновесной гибкости разных углеводородных цепей (Рабинович, Рипатти, 1990; Rabinovich, Ripatti, 1991).

В настоящей работе с целью получения оценок гибкости цепей были рассчитаны три критерия из перечисленных: отношение $\langle h_0^2 \rangle / L^2$, отношение $\langle h_0 \rangle / L$ и персистентная длина a . Последняя вычислялась методом итераций из приведенного выше соотношения $\langle h_0^2 \rangle = 2La \{1 - (a/L)[1 - \exp(-L/a)]\}$. Для вычисления отношений $\langle h_0^2 \rangle / L^2$ и $\langle h_0 \rangle / L$ использовали вычисленное в компьютерном эксперименте $\langle h_0^2 \rangle$ и значение контурной длины L . Последнее было рассчитано как сумма длин максимально вытянутых конформаций участков данной цепи: насыщенного участка, – конформации «транс-зигзага» (Волькенштейн, 1959; Флори, 1971) и ненасыщенного участка, –

«углоковообразной» конформации (Рабинович и др., 1986; Applegate, Glomset, 1986; Рабинович, Рипатти, 1990; Rabinovich, Ripatti, 1991). Смысл трех критериев очевиден: чем больше гибкость цепи, тем меньшие значения будут у характеристик a и $\langle h_0^2 \rangle / L^2$, $\langle h_0 \rangle / L$, поскольку при увеличении способности цепи к изгибу среднее расстояние между концами уменьшается.

Результаты. Величина равновесной гибкости

Различия в строении цепей описываются лишь тремя параметрами: N , k и j . В развернутом виде каждую из исследованных цепей можно представить следующим образом:

$cis\text{-}CH_3 - (CH_2)_i - (CH=CH - CH_2)_k - (CH_2)_m - CH_3$,
где $k = 4, 5$ или 6 ; $i = 1$ или 4 ; $m = 0$ или 3 .

Таблица 1. Значения отношений $\langle h_0 \rangle / L$ для групп цепей*

Цепь	$\langle h_0 \rangle / L$	Цепь	$\langle h_0 \rangle / L$
38:5(n-6)cis	0,423	38:6(n-3)cis	0,423
36:5(n-6)cis	0,430	36:6(n-3)cis	0,429
34:5(n-6)cis	0,436	34:6(n-3)cis	0,435
32:5(n-6)cis	0,442	32:6(n-3)cis	0,441
30:5(n-6)cis	0,449	30:6(n-3)cis	0,447
28:5(n-6)cis	0,456	28:6(n-3)cis	0,452
26:5(n-6)cis	0,463	26:6(n-3)cis	0,457
24:5(n-6)cis	0,472	24:6(n-3)cis	0,465
Цепь	$\langle h_0 \rangle / L$	Цепь	$\langle h_0 \rangle / L$
38:4(n-6)cis	0,434	38:5(n-3)cis	0,434
36:4(n-6)cis	0,441	36:5(n-3)cis	0,441
34:4(n-6)cis	0,449	34:5(n-3)cis	0,449
32:4(n-6)cis	0,458	32:5(n-3)cis	0,458
30:4(n-6)cis	0,466	30:5(n-3)cis	0,465
28:4(n-6)cis	0,474	28:5(n-3)cis	0,473
26:4(n-6)cis	0,482	26:5(n-3)cis	0,480
24:4(n-6)cis	0,491	24:5(n-3)cis	0,487

*Погрешности вычисления величин не превышают $\pm 0,004$.

Имитация всех молекул проводилась в идентичных условиях, поэтому изучение разницы в рассчитанных характеристиках равновесной гибкости различных молекул позволяет оценить относительный вклад отдельных углеводородных цепей в свойства мембран (или определенных областей мембран), в состав которых они входят. Сравнительный анализ критериев $\langle h_0^2 \rangle / L^2$ и $\langle h_0 \rangle / L$ для всех молекул показал, что у некоторых цепей гибкости одинаковы, в пределах погрешностей расчета, несмотря на различия в их строении. Из таких цепей можно составить группы, – по 2–4 молекулы. При этом оказалось, что на фоне совпадений величины гибкости молекул в отдельных, частных груп-

пах существует и **общая** закономерность, а именно: совпадают гибкости **пар** цепей с одинаковыми N во всем изученном диапазоне N , но с определенными комбинациями значений k и j . Эта закономерность прослеживается по значениям $\langle h_0 \rangle / L$, они специальным образом сгруппированы в табл. 1.

В верхней половине этой таблицы приведены данные для всех $(n-6)$ -пентаеновых цепей $N:5(n-6)cis$ (слева) и всех $(n-3)$ -гексаеновых цепей $N:6(n-3)cis$ (справа), т.е. попарно, с одинаковыми N в изученном диапазоне $N = 24-38$. В нижней половине таблицы – аналогичным образом приведены данные для пар цепей $(n-6)$ -тетраенов $N:4(n-6)cis$ и $(n-3)$ -пентаенов $N:5(n-3)cis$ с одинаковыми N .

Легко видеть, что для каждого N характеристика гибкости цепи пентаена $N:5(n-6)cis$ практически совпадает с характеристикой гибкости цепи гексаена $N:6(n-3)cis$, несмотря на разницу в количестве двойных связей в этих молекулах. Этот же вывод относится и к характеристикам гибкостей пар цепей тетраенов $N:4(n-6)cis$ и пентаенов $N:5(n-3)cis$ (табл. 1).

Обсуждение результатов

Закономерности, связанные с влиянием химического строения углеводородной цепи на ее гибкость и другие характеристики, как уже упоминалось, изучались ранее при исследовании обычных цепей с $N = 14-22$ и количеством двойных связей $k = 1-6$ преимущественно конфигурации *cis* (Рабинович и др., 1985; Дашевский, Рабинович, 1986; Рабинович и др., 1986; Рабинович, Рипатти, 1990, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004).

При этом было показано, что равновесная гибкость углеводородной цепи в общем случае зависит от длины цепи N , количества двойных связей k , их взаимного расположения (количества групп CH_2 , локализованных между двойными связями), местоположения всей группы двойных связей вдоль по цепи, а также конфигурации двойных связей (*cis*, *trans*). Речь идет только о цепях с несопряженными двойными связями.

Оказалось, что если сравнивать цепи с одинаковыми N и k , то цепь с метиленпрерывающимися двойными связями *cis* (между каждой парой которых локализована одна метиленовая группа) является более гибкой, чем любые цепи, между каждой парой двойных связей *cis* в которых локализовано 2, 3 или более метиленовых групп

(количество групп CH_2 может быть и неодинаковым для разных пар двойных связей). Далее, если все двойные связи *cis* являются метиленпрерывающимися, то, как правило, чем больше их в цепи, тем больше гибкость последней. Вместе с тем, при одинаковом количестве k метиленпрерывающихся двойных связей и одинаковом N в разных цепях гибкость оказывается наибольшей у молекулы, в которой вся группа двойных связей расположена наиболее близко к середине цепи. Другими словами, чем больше смещена вся группа двойных связей молекулы от центра цепи к ее концам, тем менее гибкой является молекула (это правило нарушается лишь при локализации двойной связи у 1-го или 2-го атома углерода цепи). Для двух цепей с одинаковыми N , но разным количеством двойных связей (пусть k_1 и k_2 , где $k_1 > k_2$), могут реализоваться также варианты, в которых гибкость ненасыщенной цепи с количеством двойных связей k_1 окажется меньше, чем гибкость цепи с количеством двойных связей k_2 . Это происходит в том случае, когда двойные связи в первой цепи расположены вблизи одного из ее концов, а во второй цепи – вблизи ее центра. В совокупностях молекул, в которых количество k и расположение двойных связей в цепи остаются постоянными, гибкость цепи увеличивается с ростом длины N молекулы.

Из данных таблицы 1 следует, что выводы работ (Рабинович и др., 1985; Дашевский, Рабинович, 1986; Рабинович и др., 1986; Рабинович, Рипатти, 1990, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004) справедливы и для необычно длинных цепей ацилов с $N = 24-38$. Отметим, однако, что при таком удлинении цепи (почти двукратном по сравнению с обычными ЖК) игра факторов строения цепи N , k и j в формировании ее гибкости оказалась более «тонкой», чем в обычных цепях, и фактически привела к появлению новой закономерности. В частности, чрезвычайно важным представляется тот факт, что конкуренция влияния на свойства цепи количества k двойных связей и их местоположения j в результате «компенсационного эффекта» приводит к совпадению величины гибкости у большого набора пар ацилов разного строения. К ним относятся пары $N:4(n-6)cis \leftrightarrow N:5(n-3)cis$ и $N:5(n-6)cis \leftrightarrow N:6(n-3)cis$, табл. 1.

Этот результат позволяет в некоторой степени понять и интерпретировать особенности различий в составе необычных цепей ЖК некоторых биомембран, которые были упомянуты во введении, в обзоре биохимических данных.

Рассмотрим, например, данные работы (Robinson et al., 1990): в необычных молекулах ФХ были идентифицированы именно группы цепей $N:4(n-6)cis$, $N:5(n-3)cis$ и $N:5(n-6)cis$, $N:6(n-3)cis$, свойства которых обсуждаются в данном разделе. Согласно данным (Robinson et al., 1990), в липидах мозга взрослых животных были обнаружены только цепи $N:4(n-6)cis$ и $N:5(n-3)cis$, тогда как у развивающихся – только цепи $N:5(n-6)cis$ и $N:6(n-3)cis$, $N = 24-38$. Но по результатам проведенного компьютерного моделирования именно у таких пар цепей (с одинаковыми N) выявлено равенство параметров, характеризующих гибкость цепи. Подобные совпадения в природе едва ли возникают случайно, поскольку в природных системах свойства компонентов, безусловно, должны проявиться, и разница в них (или отсутствие таковой) может привести к тому или иному эффекту.

Равенство гибкостей у цепей, отличающихся по строению, но имеющих одинаковые длины N , означает, что их вклад в «жидкость» мембраны примерно одинаков. Это утверждение следует здесь пояснить. Термин «жидкость» является скорее качественным, нежели количественным, но речь идет о мере коллективной подвижности липидных компонентов мембраны. Проведем аналогию между изменением жидкости системы и количественной характеристикой – изменением температуры ее плавления $T_{пл}$ (температуры фазового перехода из состояния геля в жидко-кристаллическое состояние), хотя зависимость между ними обратно-пропорциональная: чем выше жидкость, тем ниже температура плавления. Последняя, как известно из общих положений термодинамики и статистической физики, определяется отношением изменения энтальпии к изменению энтропии, $T_{пл} = \Delta H_{пл} / \Delta S_{пл}$. Если, например, строение цепи изменено так, что длина N не изменилась, а гибкость увеличилась, то должна увеличиться энтропия системы и в итоге уменьшится температура плавления, поскольку сохранение N означает, что энтальпия приблизительно сохраняется. Но если при $N = Const$ с изменением структуры цепи ее гибкость не изменилась, то сохранится и энтропия, а в итоге – температура плавления. Аналогично этому сохранится и жидкость мембраны. Вывод: если в мембране содержатся разные цепи, но при этом они имеют одинаковую длину и гибкость, то они приблизительно одинаково влияют на жидкость мембраны.

О функциональной роли длинноцепочечных полиненасыщенных молекул

Сформулируем, однако, основной вопрос: является ли жидкость мембраны основным фактором, когда речь идет об интерпретации экспериментальных данных работы (Robinson et al., 1990) и многих других? Кроме того, можно поставить и второй вопрос: даже если жидкость и играет в этом определенную роль, только ли поддержанием жидкости биомембраны ограничиваются функции необычно длинных полиненасыщенных цепей? Судить о возможных функциях молекул можно в значительной степени на основании данных об их физических свойствах. Для того чтобы пополнить искомые сведения о свойствах необычных полиненасыщенных цепей, можно провести «экстраполяцию» сведений о свойствах полиненасыщенных участков цепей обычного типа (поскольку в тех и других эти участки одинаковы).

По результатам расчетов методом МК, проведенных ранее (Рабинович и др., 1985; Рабинович, Рипатти, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004), было установлено, что полиненасыщенные участки цепи обладают совокупностью специфических свойств. В частности, у них многократно меньше, чем у цепей насыщенных, величины температурных коэффициентов разных геометрических характеристик, – например, среднего квадрата $\langle h_0^2 \rangle$ расстояния между концевыми атомами углерода $d \ln \langle h_0^2 \rangle / dT$. Это подтверждается и вычислениями, которые проведены в настоящей работе для цепей $18:5(n-3)cis$ и $18:0$ при $T=5^\circ\text{C}$ и $T=130^\circ\text{C}$ ($T=278$ и $T=403\text{ K}$). Оказалось, что в данном диапазоне температур коэффициент

$$d \ln \langle h_0^2 \rangle / dT = -0,105 \cdot 10^{-4} \text{ град}^{-1} \text{ для цепи } 18:5(n-3)cis \text{ и}$$

$$d \ln \langle h_0^2 \rangle / dT = -0,881 \cdot 10^{-3} \text{ град}^{-1} \text{ для цепи } 18:0.$$

Другими словами, температурный коэффициент квадрата расстояния между концами полиненасыщенной цепи $18:5(n-3)cis$ оказался примерно в 84 раза (т.е. почти на 2 порядка) меньше, чем цепи насыщенной, $18:0$. Это соответствует выводам, сделанным ранее (Рабинович и др., 1985; Рабинович, Рипатти, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004), хотя в цитированных работах при вычислениях были использованы выборки меньшего объема, чем в настоящей работе. Кроме того, результаты не-

давних расчетов (Рабинович, 2008) показали, что в полиненасыщенном участке цепи резко снижена чувствительность к изменению температуры, по сравнению с насыщенной цепью, не только характеристик, относящихся к цепи как целому (что иллюстрирует коэффициент $d \ln \langle h_0^2 \rangle / dT$), но и характеристик каждого локального ее участка, звена. Например, в полиненасыщенном участке при изменении температуры остается более стабильной форма функций распределения углов, образуемых каждой связью С-С и С-Н данной цепи с осью наибольшего ее протяжения (Рабинович, 2008).

Не анализируя подробно также и другие свойства, представляется целесообразным привести здесь кратко уже известные данные о полиненасыщенных участках цепей с метилепрерывающимися двойными связями *cis* (Рабинович и др., 1985; Рабинович, Рипатти, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004; Рабинович, 2008, 2009):

(I) При температурах **выше** температуры T_c фазового перехода гель – жидкий кристалл

– (а) в полиненасыщенных участках цепей наиболее **велики**, по сравнению с цепями насыщенными:

(1) степень ориентационного разупорядочения простых связей С-С, соседних с двойными С=C,

(2) угловые флуктуации связей С-Н во всех CH_2 -группах вдоль по цепи,

(3) пространственные флуктуации атомов углерода двойных связей С=C,

(4) гибкость, – как цепи в целом, так и каждого ее участка.

Очевидно, такие свойства могут способствовать поддержанию надлежащей конформационной подвижности молекул ферментов (что является важнейшим фактором для нормального их функционирования), если они окружены полиненасыщенными цепями. Такие свойства могут также обеспечить выигрыш в энергии липид-белковых взаимодействий по всей поверхности контакта молекул, создать надлежащие условия для согласованного взаимодействия отдельных ферментов сложных энзиматических систем;

– (б) характеристики полиеновой цепи в целом и каждого ее сегмента (связи) в отдельности являются **наиболее стабильными** при изменении температуры по сравнению с характеристиками насыщенных олигомеров.

Если аннулярный слой вокруг ферментов обогащен полиненасыщенными цепями, то та-

кие свойства последних могут более надежно обеспечить стабильность условий и оптимизировать липид-белковые взаимодействия при флуктуациях температуры, причем, на каждом малом участке вдоль всей поверхности контакта белков и полиненасыщенных цепей. Иначе говоря, эти свойства полиненасыщенных цепей должны ослабить негативное воздействие изменений температуры на активность ферментов. С другой стороны, повышение концентрации полиненасыщенных цепей в слоях вокруг ферментов может способствовать увеличению активности ферментов при общем повышении уровня метаболизма.

(II) При температурах **ниже** температуры фазового перехода гель – жидкий кристалл наиболее вероятная конформация, которую принимает полиненасыщенная цепь, является вытянутой и имеет «уголкообразную» форму; она комплементарна аналогичным конформациям других полиненасыщенных цепей, а также конформациям «транс-зигзаг», в которые с наибольшей вероятностью переходят при низких температурах насыщенные цепи. Такое свойство полиненасыщенной цепи может ослабить разрушительное влияние низких температур на мембранные структуры, поскольку при глубоком охлаждении возникают такие упаковки полиненасыщенных цепей липидов с насыщенными, в которых не возникают высокие механические напряжения.

Таким образом, свойства полиненасыщенных участков цепей по сравнению с насыщенными, моно- и диненасыщенными оказываются **экстремальными**. Поэтому разумно полагать, что и функции в биологических мембранах полиненасыщенных углеводородных цепей, в том числе и необычных, вполне могут (даже, скорее, должны) быть более **специфичными**. Они не должны ограничиваться лишь задачей поддержания жидкостности системы на должном уровне. При изменении внешних условий биологическая мембрана будет стремиться сохранить должный уровень свойств, изменяя оптимальным образом (в рамках имеющихся возможностей) строение своих компонентов. Судя по экспериментальным значениям температур плавления обычных углеводородных цепей разной степени ненасыщенности, и молекул липидов с такими цепями (Коупова R, Caffrey, 1998), для существенного изменения температуры плавления мембраны и тем самым достижения в ней должной степени жидкостности (выше об этом уже шла речь) достаточно, с формальной точки зре-

ния, заменить часть насыщенных углеводородных цепей в липидах цепями лишь с одной и/или двумя двойными связями (или наоборот).

Действительно, небольшие, на первый взгляд, изменения химической структуры липидных молекул с «обычными» цепями вызывают весьма ощутимый эффект в их свойствах. Согласно экспериментальным данным, собранным в работе (Коупова R, Caffrey, 1998), замена лишь одной простой связи C-C в одной насыщенной цепи липидной молекулы 18:0/18:0 ФХ на двойную C=C, т.е. переход к молекуле 18:0/18:1(n-9)*cis* ФХ, приводит к понижению температуры плавления $T_{пл}$, соответственно, от величины $54,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ до $6,9^{\circ}\text{C} \pm 2,9^{\circ}\text{C}$. Замена второй простой связи на двойную, т.е. переход к молекуле 18:0/18:2(n-6)*cis* ФХ, снижает температуру $T_{пл}$ до отрицательных значений $-14,4^{\circ}\text{C} \pm 4,1^{\circ}\text{C}$ (Коупова R, Caffrey, 1998). Но дальнейшее увеличение количества двойных связей в одной из цепей липидной молекулы уже не приводит к понижению температуры плавления $T_{пл}$. Так, в случае молекул 18:0/18:3(n-3)*cis* ФХ температура $T_{пл} = -12,3^{\circ}\text{C} \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ (Коупова R, Caffrey, 1998), что даже выше, нежели у молекулы 18:0/18:2(n-6)*cis* ФХ. Цепи более высокой степени ненасыщенности и большей длины ситуации не меняют: для 18:0/20:4(n-6)*cis* ФХ $T_{пл} = -12,9^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Вариант с цепью 22:6(n-3)*cis*, несмотря на увеличение количества двойных связей до 6 (хотя и при одновременном увеличении длины цепи до 22), приводит к обратному эффекту: для молекул 18:0/22:6(n-3)*cis* ФХ температура $T_{пл} = -3,8^{\circ}\text{C} \pm 1,8^{\circ}\text{C}$. В совокупности молекул 16:0/18:1(n-9)*cis* ФХ, 16:0/18:2(n-6)*cis* ФХ, ..., т.е. молекул с *sn*-1 цепью 16:0 вместо 18:0, закономерности изменения температуры плавления аналогичны вышеуказанным (Коупова R, Caffrey, 1998).

Итак, осуществить основные гомеовязкостные функции в мембране могли бы насыщенные, мононенасыщенные и диненасыщенные цепи 16:0, 18:0, 18:1(n-9)*cis*, 18:2(n-6)*cis*, эти же цепи могут являться основным строительным материалом биомембраны. С точки зрения формальной логики, цепей с более высокой степенью ненасыщенности для поддержания в мембране должного уровня жидкостности не требуется. Безусловно, этот вывод можно перенести и на более длинные цепи ЖК, обсуждаемые в настоящей работе. Вместе с тем в мембранах есть большое количество полиненасыщенных цепей, так что основная роль их, согласно той же логике, должна быть более **специфичной**.

То, что **специфичность** роли в биомембране полиненасыщенных цепей, как обычных, так и необычно длинных, существует реально, усматривается также в том, что полиненасыщенных цепи распределены в матрице мембраны не непрерывно, а локально, – преимущественно в областях, непосредственно примыкающих к интегральным белкам. Если учесть перечисленные выше свойства таких цепей, то факт сосредоточения полиненасыщенных цепей именно в подобных, пограничных с белками, слоях представляется вполне естественным и целесообразным. Соответствующая концепция для обычных полиненасыщенных цепей впервые была сформулирована в работе (Рабинович и др., 1985). Позднее появились предположения о сходной роли необычно длинных полиеновых цепей (Aveldañо, 1987; Aveldañо, 1988). Однако, в работе (Aveldañо, 1988) подразумевалось, что наличие двойных связей делает ненасыщенные цепи более жесткими по сравнению с насыщенными, тогда как ранее в работах (Рабинович и др., 1985; Рабинович и др., 1986) уже было показано, что ситуация здесь является обратной. Более низкие барьеры внутреннего вращения вокруг двух простых связей, примыкающих к двойной, и геометрические особенности последней (Волькенштейн, 1959; Флори, 1971), как оказалось, приводят к тому, что вероятность изгиба ненасыщенной цепи оказывается больше, чем насыщенной (Рабинович и др., 1985; Рабинович и др., 1986).

Интерпретируем теперь приведенные выше биохимические данные работы (Robinson et al., 1990) с использованием этой концепции (в оригинале – из работы Рабинович и др., 1985). Обратим внимание на то, что при переходе от длинноцепочечных молекул в липидах мозга развивающихся животных к цепям липидов мозга взрослых животных изменения в их структуре оказались минимальными. А именно, лишь уменьшилось на единицу количество двойных связей, хотя оно все равно осталось большим: речь идет о необычных полиеновых цепях с не менее чем четырьмя двойными связями. Функционирование ферментов развивающихся особей, очевидно, происходит более интенсивно, чем взрослых, что требует более высокой стабилизации условий в аннулярных липидных слоях, т.е. более высокой степени ненасыщенности участков углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к ферментам. В итоге появились пента- и гексаеновые цепи ЖК вместо тетра- и пентаеновых (Robinson et al., 1990).

С другой стороны, соответствующие ферменты, по-видимому, обладают размерами, достаточно протяженными вдоль нормали к поверхности мембраны. В условиях, когда требуется создать стабильный аннулярный слой на большую, чем обычно, глубину, и может включиться механизм «удлинения» цепей. Действительно, в обычных условиях роль стабилизатора могут играть такие цепи, как 20:4(n-6)*cis*, 22:5(n-6)*cis*, 22:6(n-3)*cis*, входящие в молекулы ФХ в *sn*-2-положениях, тогда как *sn*-1-положения могут быть традиционно заняты насыщенными цепями 18:0 и 16:0. Для ферментов с более протяженными размерами такие цепи, как 22:6(n-3)*cis* уже не могут обеспечить стабилизацию условий на должную глубину. Поэтому помимо таких полиненасыщенных цепей, расположенных в *sn*-2-положениях, возникают в *sn*-1-положениях «длинноцепочечные» ацилы (n-6) и (n-3), завершающий полинасыщенный участок которых обеспечивает надлежащее удлинение области стабильных условий в аннулярных липидных слоях встроенных в мембрану ферментов. Косвенно это подтверждается количественными данными (Рабинович, Рипатти, 1990; Rabinovich, Ripatti, 1991): максимально вытянутая насыщенная цепь 18:0 (в транс-конформации) и полиненасыщенная цепь 22:6(n-3)*cis* в вытянутой «угловообразной» конформации имеют примерно одинаковую длину: 2,163 нм для 18:0, и 2,184 нм для 22:6(n-3)*cis* (Рабинович, Рипатти, 1990; Rabinovich, Ripatti, 1991). Поэтому цепь 22:6(n-3)*cis* из *sn*-2-положения и полиненасыщенный участок длинноцепочечного ацила из *sn*-1-положения (если насыщенный фрагмент *sn*-1-цепи содержит ~15–18 атомов углерода) следуют вдоль нормали к поверхности мембраны непосредственно друг за другом. В итоге они образуют на границе с мембрановстроенным ферментом единую протяженную область с полиненасыщенными цепями.

Далее, синтез «длинноцепочечных» полиненасыщенных ЖК компонентов липидов происходит с помощью элонгаз (см., напр., обзор Leonard et al., 2004). Имеются данные о том, что существует множество энзимов, удлиняющих цепь, являющихся специфичными для ЖК разной длины и степени ненасыщенности (Luthria, Sprecher, 1997). Поэтому синтез необходимых цепей может производить как (n-6)-элонгаза, – из цепей 20:4(n-6)*cis*, 22:5(n-6)*cis*, так и (n-3)-элонгаза, – из цепи 22:6(n-3)*cis*. Как следует из проведенных здесь расчетов, приемлемыми оказываются оба варианта, они приводят к возник-

новению длинных ЖК цепей с близкими свойствами (эти пары вариантов приведены в табл. 1). Этот факт является благоприятным, он позволяет эффективно достигать необходимого количества полиненасыщенных цепей с искомыми свойствами (хотя это количество невелико, такие цепи составляют всего ~1–5% от общей суммы ЖК), поскольку потребность в них может быть восполнена не на одном, а на нескольких биохимических путях. Возможен также вариант их синтеза универсальной элонгазой, не различающей положений (n-3) и (n-6). Поскольку размеры ферментов разного типа должны различаться, требуется целая совокупность специфических полиеновых цепей в определенном диапазоне длин N (в данном случае $24 \leq N \leq 38$).

В свете обсуждаемой концепции можно интерпретировать и ряд других экспериментальных биохимических данных, – например, цитированной выше работы (Poulos et al., 1988), согласно которой в тканях мозга при его нормальном состоянии выявлены тетра- и пентаеновые ЖК цепи, тогда как при недостатке пероксисом (т.е. при наличии болезни Цельвегера) – пента- и гексаеновые. По-видимому, пента- и гексаеновые цепи были необходимы на стадии формирования мозга, когда ферментные системы развивают высокую активность и окружающие (аннулярные) липидные слои призваны поддерживать высокую стабильность условий, и потому нужна большая степень ненасыщенности цепей. В дальнейшем, при нормальном состоянии мозга, необычные длинные гексаеновые цепи были бы в пероксисомах превращены в обычные гексаеновые цепи (например, 22:6(n-3)*cis*), поскольку на этом этапе для нормального функционирования совокупности белков, по-видимому, необходимо окружение из менее ненасыщенных обычных цепей, – тетра- и пентаеновых, которые и синтезируются. В том же случае, когда возникает болезнь Цельвегера (недостаток пероксисом), процесс замены цепей нарушается или отсутствует совсем, вследствие чего гексаеновые цепи не преобразуются, остаются в наличии, что и объясняет данные работы (Poulos et al., 1988).

Необходимо затронуть и другой аспект. А именно, в биомембранах могут быть использованы свойства отдельных **участков** длинноцепочечных молекул. Действительно, каждая из них содержит два протяженных фрагмента цепи с разными свойствами, – насыщенный и полиненасыщенный (по сути они являются своего рода олигомерными аналогами блоксополимеров).

Предположим, что такие необычные цепи все-таки не связаны с интегральными белками, а присутствуют в липидной матрице наряду с обычными цепями. Тогда возникает вопрос о возможности формирования стабильного липидного бислоя, как такового, т.е. о способе размещения в бислое необычных длинных цепей. «Выступающим» из монослоя фрагментом таких цепей был бы соответствующий полиненасыщенный фрагмент, поскольку длина N первоначальных насыщенных участков (вплоть до 22:0) длинных цепей отвечает длине цепи обычных липидов. Размеры цепей в таких участках согласуются со средней толщиной липидного монослоя. Концевой полиненасыщенный фрагмент необычной длинной цепи ЖК должен либо проникнуть в противоположный монослой бислоя, либо за счет изгиба вернуться в исходный монослой.

Для оценки ситуации нужно знать, сколько раз цепь полиненасыщенного участка может «сложиться сама на себя». Для этого в настоящей работе и были вычислены величины персистентных длин a таких участков. В диапазоне длин $N = 24-38$ молекулы типа $N:4(n-3)cis$ можно условно представить суммой насыщенных олигомеров от 10:0 до 24:0 и полиненасыщенного фрагмента $15:4(n-3)cis$; молекулы $N:5(n-3)cis$ – суммой аналогичных насыщенных олигомеров и фрагмента $18:5(n-3)cis$; молекулы $N:6(n-3)cis$ – суммой насыщенных олигомеров и фрагмента $21:6(n-3)cis$, и т.д.

Расчет, проведенный для фрагмента $15:4(n-3)cis$, показал, что его контурная длина L примерно в 3,9 раза больше его персистентной длины a . Аналогично, расчет показал, что отношение $L/a = 5,1$ для фрагмента $18:5(n-3)cis$ и $L/a = 6,2$ для фрагмента $21:6(n-3)cis$. Величина сегмента Куна, т.е. величина связи эквивалентной свободно-сочлененной цепи, примерно в 2 раза больше персистентной длины (Флори, 1971). Следовательно, сегментов Куна в рассмотренных нами полиненасыщенных фрагментах $15:4(n-3)cis$, $18:5(n-3)cis$, $21:6(n-3)cis$ содержится всего ~ 2 , $\sim 2,5$ или ~ 3 , соответственно. Близкие значения получены и для других фрагментов. Это означает, что, в зависимости от длины фрагмента, он может сложиться всего в 2–3 раза. При этом очевидно, что в итоге значительная часть цепи таких полиненасыщенных фрагментов (~ 7 атомов углерода) осталась бы вне исходного монослоя, что вносило бы значительное возмущение в структуру мембраны.

Итак, обсуждавшаяся выше концепция о локализации молекул липидов с необычными длинными цепями в специальных областях, – пограничных слоях с мембраносвязанными включениями, белками, представляется более реалистичной, чем локализация необычных липидных молекул в произвольных местах мембраны. В пользу этой концепции свидетельствует также то, что положение длинных полиненасыщенных цепей в липидной молекуле является необычным ($sn-1$), и тот факт, что еще одна полиненасыщенная цепь имеется в положении $sn-2$ той же липидной молекулы (Robinson et al., 1990; Aveldaño, 1987; Aveldaño, Sprecher, 1987).

Заключение

В липид-белковых взаимодействиях существенное значение имеет не только тип липидных молекул и их углеводородных цепей, но и структура конкретных белков, и для более детальной интерпретации огромного разнообразия ситуаций в биологических мембранах требуются дальнейшие исследования. Вместе с тем важно подчеркнуть, что существенную роль в выработке и обосновании уже предложенных идей сыграли данные о свойствах липидных цепей, первоначально полученные именно теоретически, методом компьютерного эксперимента.

Полученные методом статистических испытаний (МК) выводы о том, что гибкость полиненасыщенных цепей с метиленпрерывающимися двойными связями *cis* значительно выше, чем таковая насыщенных цепей (Рабинович и др., 1985; Дашевский, Рабинович, 1986; Рабинович и др., 1986; Рабинович, Рипатти, 1990, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а), были дополнены расчетами других свойств ненасыщенных цепей методом МК (Rabinovich, Ripatti, 2001, 2002; Рабинович, Рипатти, 1999, 1999а, 2000, 2000а, 2002; Рабинович, 2008, 2009) и методом молекулярной динамики (Балабаев и др., 1994, 1994а; Rabinovich et al., 2002; Рабинович и др., 2002; Rabinovich et al., 2003; Leermakers et al., 2003; Рабинович и др., 2004; Рабинович, 2009). Эти выводы уже подтверждены разными исследовательскими группами (Everts, Davis, 2000; Saiz, Klein, 2001, 2001а; Petrache et al., 2001; Feller S.E. et al., 2002; Huber et al., 2002; Eldho et al., 2003; Soubias, Gawrisch, 2007), которыми были использованы методы физического эксперимента, квантовохимические расчеты и молекулярно-динамическое моделирование. Представления, развиваемые авторами работ (Рабинович и др., 1985; Дашевский, Рабинович,

1986; Рабинович и др., 1986; Рабинович, Рипатти, 1990, 1990а; Rabinovich, Ripatti, 1991, 1991а; Рабинович, Рипатти, 1994; Рабинович и др., 2004а; Рабинович, 2008, 2009), оказались конструктивными и для трактовки результатов некоторых других биохимических исследований (см., напр., Shulman, Love, 1999; Jøstensen, 1998).

Данные о свойствах необычных полиненасыщенных липидных цепей, полученные в настоя-

щей работе, позволяют достигнуть определенного понимания взаимосвязей «структура – свойства – функции» для еще более широкого класса цепей ЖК.

Работа поддержана РФФИ (проект 10-03-00201а), программой Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4 и Swedish Institute Visby programme 00961/2008, 00675/2009.

Литература

Балабаев Н. К., Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1994. О кинетической гибкости докозагексаеновой цепи с метилепрерывающимися двойными цис-связями // Журн. физ. химии. – Т. 68. – № 2. – С. 376–377.

Балабаев Н. К., Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1994а. Моделирование динамики полиненасыщенных липидов биологических мембран // Биофизика. – Т. 39. – Вып. 2. – С. 312–322.

Бирштейн Т. М., Птицын О. Б., 1964. Конформация макромолекул. М.: Наука. – 392 с.

Волькенштейн М. В., 1959. Конфигурационная статистика полимерных цепей. М.; Л.: Изд-во АН СССР. – 466 с.

Готлиб Ю. Я., Даринский А. А., Светлов Ю. Е., 1986. Физическая кинетика макромолекул. Л.: Химия. – 272 с.

Гроссберг А. Ю., Хохлов А. Р., 1989. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука. – 344 с.

Дашевский В. Г., 1987. Конформационный анализ макромолекул. М.: Наука. – 285 с.

Дашевский В. Г., Рабинович А. Л., 1983. Конформационный анализ полиненасыщенных макромолекул в растворе. Континуум-модель // Высокомолек. соед. А. – Т. 25. – № 3. – С. 544–550.

Дашевский В. Г., Рабинович А. Л., 1986. О равновесной гибкости цепей полиметилена. Континуум-модель // Высокомолек. соед. А. – Т. 28. – № 6. – С. 1204–1210.

Рабинович А. Л., 2008. Температурная зависимость конформационных свойств олигомерных цепей природных липидов: компьютерное моделирование // Биофизика. – Т. 53. – Вып. 3. – С. 426–433.

Рабинович А. Л., 2009. Цепные молекулы как компоненты мембранных систем: компьютерное моделирование // Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров. Отв. ред. В. А. Иванов, А. Л. Рабинович, А. Р. Хохлов. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». – С. 409–454.

Рабинович А. Л., Дашевский В. Г., Рипатти П. О., 1986. Изучение термодинамической гибкости макромолекул с двойными связями в основной цепи. Континуум-модель // Высокомолек. соед. А. – Т. 28. – № 8. – С. 1697–1705.

Рабинович А. Л., Иванов В. А., 2009. Обзор методов компьютерного моделирования молекулярных систем: метод Монте-Карло // Методы компьютерного модели-

рования для исследования полимеров и биополимеров. Отв. ред. В. А. Иванов, А. Л. Рабинович, А. Р. Хохлов. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». – С. 63–119.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1990. Равновесная гибкость природных углеводородных цепей // Биофизика. – Т. 35. – Вып. 5. – С. 775–778.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1990а. О конформационных свойствах и функциях докозагексаеновой кислоты // Доклады АН СССР. – Т. 314. – № 3. – С. 752–756.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1994. Полиненасыщенные углеводородные цепи липидов: структура, свойства, функции // Успехи совр. биологии. – Т. 114. – № 5. – С. 581–594.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1999. О внутримолекулярном упорядочении связей в цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновой цепи // Доклады Академии Наук. – Т. 364. – № 2. – С. 264–267.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 1999а. Исследование на ЭВМ внутримолекулярного упорядочения связей: ненасыщенные цепи природных липидов // Биол. мембраны. – Т. 16. – № 5. – С. 563–576.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 2000. Компьютерное исследование внутримолекулярной упорядоченности в октадекатриеновых цепях с цис-двойными связями // Биофизика. – Т. 45. – Вып. 5. – С. 816–822.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 2000а. Полиненасыщенные углеводородные цепи: изучение на ЭВМ характеристик внутримолекулярной упорядоченности связей // Биофизика. – Т. 45. – Вып. 5. – С. 823–830.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., 2002. Изучение свойств углеводородных олигомеров методом Монте-Карло // Журн. физ. химии. – Т. 76. – № 11. – С. 1997–2001.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., Балабаев Н. К., 2002. Молекулярная динамика липидных бислоев: флуктуационные свойства углеводородных цепей // Журн. физ. химии. – Т. 76. – № 11. – С. 2007–2011.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., Балабаев Н. К., 2004. Компьютерное моделирование биологических мембран // Труды КарНЦ РАН. Петрозаводск, Изд. КарНЦ РАН. – Вып. 6. – С. 99–137.

Рабинович А. Л., Рипатти П. О., Балабаев Н. К., 2004а. Компьютерное моделирование гидратированных бислоев ненасыщенных фосфатидилхолинов // Журн. физ. химии. – Т. 78. – № 7. – С. 1160–1165.

- Рабинович А. Л., Рипатти П. О., Дашевский В. Г., 1985. Температурная зависимость конформационных характеристик природных полиненасыщенных углеводородных цепей // *Биофизика*. – Т. 30. – Вып. 5. – С. 802–806.
- Флори П., 1971. *Статистическая механика цепных молекул*. М.: Мир. – 440 с.
- de Almeida R.F.M., Borst J., Fedorov A., Prieto M., Visser A.J.W.G., 2007. Complexity of Lipid Domains and Rafts in Giant Unilamellar Vesicles Revealed by Combining Imaging and Microscopic and Macroscopic Time-Resolved Fluorescence // *Biophys. J.* – V. 93. – No.2. – P. 539–553.
- Antollini S.S., Aveldaño M.I., 2002. Thermal behavior of liposomes containing PCs with long and very long chain PUFAs isolated from retinal rod outer segment membranes // *J. Lipid Res.* – V. 43. – P. 1440–1449.
- Applegate K.R., Glomset J.A., 1986. Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid // *J. Lipid Res.* – V. 27. – P. 658–680.
- Aveldaño M.I., 1987. A Novel Group of Very Long Chain Polyenoic Fatty Acids in Dipolyunsaturated Phosphatidylcholines from Vertebrate Retina // *J. Biol. Chem.* – V. 262. – No.3. – P. 1172–1179.
- Aveldaño M.I., 1988. Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes // *Biochemistry*. – V. 27. – No.4. – P. 1229–1239.
- Aveldaño M.I., Sprecher H., 1987. Very Long Chain (C24 to C36) Polyenoic Fatty Acids of the n – 3 and n – 6 Series in Dipolyunsaturated Phosphatidylcholines from Bovine Retina // *J. Biol. Chem.* – V. 262. – No.3. – P. 1180–1186.
- Bakht O., Pathak P., London E., 2007. Effect of the Structure of Lipids Favoring Disordered Domain Formation on the Stability of Cholesterol-Containing Ordered Domains (Lipid Rafts): Identification of Multiple Raft-Stabilization Mechanisms // *Biophys. J.* – V. 93. – No.12. – P. 4307–4318.
- Djerassi C., Lam W.K., 1991. Phospholipid studies of marine organisms. Part 25. Sponge phospholipids // *Acc. Chem. Res.* – V. 24. – P. 69–75.
- Edidin M., 2003. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers // *Nature Reviews. Mol. Cell Biol.* – V. 4. – P. 414–418.
- Eldho N.V., Feller S.E., Tristram-Nagle S., Polozov I.V., Gawrisch K., 2003. Polyunsaturated Docosahexaenoic vs Docosapentaenoic Acids. Differences in Lipid Matrix Properties from the Loss of One Double Bond // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 125. – No.21. – P. 6409–6421.
- Everts S., Davis J.H., 2000. ^{1H} and ^{13C} NMR of Multilamellar Dispersions of Polyunsaturated (22:6) Phospholipids // *Biophys. J.* – V. 79. – P. 885–897.
- Feller S.E., 2008. Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids // *Chem. Phys. Lipids*. – V. 153. – No.1. – P. 76–80.
- Feller S.E., Gawrisch K., Mac Kerell A.D., 2002. Polyunsaturated Fatty Acids in Lipid Bilayers: Intrinsic and Environmental Contributions to Their Unique Physical Properties // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 124. – No.2. – P. 318–326.
- Furland N.E., Maldonado E.N., Aresti P.A., Aveldaño M.I., 2007. Changes in Lipids Containing Long- and Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Cryptorchid Rat Testes // *Biol. Reprod.* – V. 77. – P. 181–188.
- Furland N.E., Oresti G.M., Antollini S.S., Venturino A., Maldonado E.N., Aveldaño M.I., 2007a. Very Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Are the Major Acyl Groups of Sphingomyelins and Ceramides in the Head of Mammalian Spermatozoa // *J. Biol. Chem.* – V. 282. – No.25. – P. 18151–18161.
- Furland N.E., Zanetti S.R., Oresti G.M., Maldonado E.N., Aveldaño M.I., 2007. Ceramides and Sphingomyelins with High Proportions of Very Long-chain Polyunsaturated Fatty acids in Mammalian Germ Cells // *J. Biol. Chem.* – V. 282. – No.25. – P. 18141–18150.
- van Gunsteren W.F., Dolenc J., Mark A.E., 2008. Molecular simulation as an aid to experimentalists // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – V. 18. – No.2. – P. 149–153.
- Le Guyader L., Le Roux C., Mazères S, Gaspard-Iloughmane H., Gornitzka H., Millot C., Mingotaud C., Lopez A., 2007. Changes of the Membrane Lipid Organization Characterized by Means of a New Cholesterol-Pyrene Probe // *Biophys. J.* – V. 93. – No.12. – P. 4462–4473.
- Hardy S.J., Robinson B.S., Ferrante A., Hii C.S.T., Johnson D.W., Poulos A., Murray A.W., 1995. Polyenoic very-long-chain fatty acids mobilize intracellular calcium from a thapsigargin-insensitive pool in human neutrophils. The relationship between Ca²⁺ mobilization and superoxide production induced by long- and very-long-chain fatty acids // *Biochem. J.* – V. 311. – P. 689–697.
- Huber T., Rajamoorthi K., Kurze V.F., Beyer K., Brown M.F., 2002. Structure of Docosahexaenoic Acid-Containing Phospholipid Bilayers as Studied by ^{2H} NMR and Molecular Dynamics Simulations // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 124. – No.2. – P. 298–309.
- Joseph J.D., 1979. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates // *Prog. Lipid Res.* – V. 18. – P. 1–48.
- Jost P.C., McMillen D.A., Morgan W.D., Stoeckenius W., 1978. // In: *Light-Transducing Membranes*. Deamer D., Ed. N.Y., Acad. Press, P. 141–154.
- Jøstensen J.-P., 1998. Heterotrophic microorganisms as de novo producers of polyunsaturated fatty acids. Dr. Sci. Thesis. Tromsø, Norway.
- Koynova R., Caffrey M., 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines // *Biochim. Biophys. Acta*. – V. 1376. – P. 91–145.
- Leermakers F.A.M., Rabinovich A.L., Balabaev N.K., 2003. Self-consistent-field modelling of unsaturated phosphatidylcholine liquid-crystalline bilayers and comparison to all-atom molecular dynamics

- simulation // *Physical Review. E.* – V. 67. – No.1. – P. 011910_1–011910_17.
- Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Huang Y.-S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids // *Progr. Lipid Res.* – V. 43. – P. 36–54.
- Litchfield C., Tyszkiewicz J., Marcantonio E.E., Noto G., 1979. 15,18,21,24-triacontatetraenoic and 15,18,21,24,27-triacontapentaenoic acids: new C30 fatty acids from the marine sponge *Cliona celata* // *Lipids.* – V. 14. – No.7. – P. 619–622.
- Luthria D.L., Sprecher H., 1997. Studies to determine if rat liver contains multiple chain elongating enzymes // *Biochim. Biophys. Acta. – Lipids and Lipid Metabolism.* – V. 1346. – No.3. – P. 221–230.
- Mansour M.P., Volkman J.K., Holdsworth D.G., Jackson A.E., Blackburn S.I., 1999. Very long-chain (C28) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates // *Phytochemistry.* – V. 50. – P. 541–548.
- Marrink S.J., de Vries A.H., Tieleman D.P., 2009. Lipids on the move: Simulations of membrane pores, domains, stalks and curves // *Biochim. Biophys. Acta.* – V. 1788. – P. 149–168.
- McMahon A., Jackson S.N., Woods A.S., Kedzierski W., 2007. A Stargardt disease-3 mutation in the mouse *Elovl4* gene causes retinal deficiency of C32–C36 acyl phosphatidylcholines // *FEBS Lett.* – V. 581. – P. 5459–5463.
- Pandit S.A., Jakobsson E., Scott H.L., 2004. Simulation of the early stages of nano-domain formation in mixed bilayers of sphingomyelin, cholesterol, and dioleoylphosphatidylcholine // *Biophys. J.* – V. 87. – No.5. – P. 3312–3322.
- Van Pelt C.K., Huang M.C., Tschanz C.L., Brenna J.T., 1999. An octaene fatty acid, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-octacosaoctanoic acid (28:8n-3), found in marine oils // *J. Lipid Res.* – V. 40. – P. 1501–1505.
- Petrache H.I., Salmon A., Brown M.F., 2001. Structural Properties of Docosahexaenoyl Phospholipid Bilayers Investigated by Solid-State ²H NMR Spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 123. – No.50. – P. 12611–12622.
- Pike L.J., 2009. The challenge of lipid rafts // *J. Lipid. Res.* – V. 50. – P. S323–S328.
- Poulos A., Sharp P., Johnson D., Easton C., 1988. The occurrence of polyenoic very long chain fatty acids with greater than 32 carbon atoms in molecular species of phosphatidylcholine in normal and peroxisome-deficient (Zellweger's syndrome) brain // *Biochem. J.* – V. 253. – P. 645–650.
- Rabinovich A.L., 1991. Computerized theoretical study of local structural properties of polyene and polymethylene chains in solutions. The continuum model // *Makromol. Chem.* – V. 192. – No. 2. – P. 359–375.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., 1991. On the conformational, physical properties and functions of polyunsaturated acyl chains // *Biochim. Biophys. Acta.* – V. 1085. – No.1. – P. 53–62.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., 1991a. The flexibility of natural hydrocarbon chains with non-methylene-interrupted double bonds // *Chem. Phys. Lipids.* – V. 58. – No.3. – P. 185–192.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., 2001. Monte Carlo simulations of hydrocarbon oligomeric chains. Shape and dimension characteristics // *Proceedings of SPIE.* – V. 4348. – P. 225–236.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., 2002. Monte Carlo simulations of hydrocarbon oligomeric chains: carbon skeleton cross sectional areas // *Proceedings of SPIE.* – V. 4627. – P. 118–128.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M., 2002. Comparative investigation of lipid membrane systems // *Proceedings of SPIE.* – V. 4627. – P. 141–153.
- Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M., 2003. Molecular dynamics simulations of hydrated unsaturated lipid bilayers in the liquid-crystal phase and comparison to self-consistent field modeling // *Physical Review. E.* – V. 67. – No.1. – P. 011909_1–011909_14.
- Řezanka T., 1989. Very-long-chain fatty acids from the animal and plant kingdoms // *Prog. Lipid Res.* – V. 28. – P. 147–187.
- Řezanka T., 2000. Analysis of very long chain polyunsaturated fatty acids using high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry // *Biochemical Systematics and Ecology.* – V. 28. – No.9. – P. 847–856.
- Řezanka T., Nedbalova L., Sigler K., 2008. Identification of very-long-chain polyunsaturated fatty acids from *Amphidinium carterae* by atmospheric pressure chemical ionization–liquid chromatography–mass spectroscopy // *Phytochemistry.* – V. 69. – No.12. – P. 2391–2399.
- Řezanka T., Nedbalova L., Sigler K., 2008a. Odd-numbered very-long-chain polyunsaturated fatty acids from the dinoflagellate *Amphidinium carterae* identified by atmospheric pressure chemical ionization–liquid chromatography–mass spectroscopy // *Phytochemistry.* – V. 69. – No.16. – P. 2849–2855.
- Řezanka T., Sigler K., 2009. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms // *Progr. Lipid Res.* – V. 48. – No.3–4. – P. 206–238.
- Risselada H.J., Marrink S.J., 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – V. 105. – No.45. – P. 17367–17372.
- Robinson B.S., Johnson D.W., Poulos A., 1990. Unique molecular species of phosphatidylcholine containing very-long-chain (C24–C38) polyenoic fatty acids in rat brain // *Biochem. J.* – V. 265. – P. 763–767.
- Rotstein N.P., Aveldaño M.I., 1988. Synthesis of very long chain (up to 36 carbon) tetra, penta and

hexaenoic fatty acids in retina // *Biochem. J.* – V. 249. – No.1. – P. 191–200.

Saiz L., Klein M.L., 2001. Influence of highly polyunsaturated lipid acyl chains of biomembranes on the NMR order parameters // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 123. – P. 7381–7387.

Saiz L., Klein M.L., 2001a. Structural properties of a highly polyunsaturated lipid bilayer from molecular dynamics simulations // *Biophys. J.* – V. 81. – P. 204–216.

Schultz Z.D., Levin I.W., 2008. Lipid Microdomain Formation: Characterization by Infrared Spectroscopy and Ultrasonic Velocimetry // *Biophys. J.* – V. 94. – No.8. – P. 3104–3114.

Shaikh S.R., Edidin M., 2006. Membranes are not just rafts // *Chem. Phys. Lipids.* – V. 144. – P. 1–3.

Shulman G.E., Love R.M., 1999. *The Biochemical Ecology of Marine Fishes. Advances in Marine Biology*, V.36. A.J. Southward, P.A. Tyler, C.M. Young, eds. San Diego etc.: Academic Press. – 351 p.

Soni S.P., LoCascio D.S., Liu Y., Williams J.A., Bittman R., Stillwell W., Wassall S.R., 2008. Docosahexaenoic Acid Enhances Segregation of Lipids between Raft and Nonraft Domains: ^2H -NMR Study // *Biophys. J.* – V. 95. – No.1. – P. 203–214.

Soubias O., Gawrisch K., 2007. Docosahexaenoyl Chains Isomerize on the Sub-Nanosecond Time Scale // *J. Am. Chem. Soc.* – V. 129. – No.21. – P. 6678–6679.

Stillwell W., 2008. Docosahexaenoic acid: a most unusual fatty acid // *Chem. Phys. Lipids.* – V. 153. – No.1. – P. 1–2.

Stillwell W., Wassall S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid // *Chem. Phys. Lipids.* – V. 126. – P. 1–27.

Valentine R.C., Valentine D.L., 2004. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept // *Progr. Lipid Res.* – V. 43. – P. 383–402.

Wassall S.R., Stillwell W., 2008. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain // *Chem. Phys. Lipids.* – V. 153. – No.1. – P. 57–63.

Yethiraj A., Weisshaar J.C., 2007. Why Are Lipid Rafts Not Observed In Vivo? // *Biophys. J.* – V. 93. – No.9. – P. 3113–3119.

Zanetti S.R., Maldonado E.N., Avelaño M.I., 2007. Doxorubicin Affects Testicular Lipids with Long-Chain (C18-C22) and VeryLong-Chain (C24-C32) Polyunsaturated Fatty Acids // *Cancer. Res.* – V. 67. – No.14. – P. 6973–6980.

UNUSUAL VERY LONG POLYENOIC CHAINS OF PHOSPHOLIPIDS: MONTE CARLO COMPUTER SIMULATION STUDY OF PROPERTIES

A.L. Rabinovich, P.O. Ripatti

*Institute of Biology Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: rabinov@krc.karelia.ru*

Monte Carlo computer simulations of very long polyunsaturated hydrocarbon chains with methylene-interrupted *cis* double bonds, N:4(n-6)*cis*, N:4(n-3)*cis*, N:5(n-6)*cis*, N:5(n-3)*cis*, N:6(n-6)*cis*, N:6(n-3)*cis* were carried out at temperature 25 °C, where N is carbon atom number, N = 24, 26, 28, ..., 38.

A special rule for modification of a chain structure was elucidated: if saturation of one double bond localized on the third carbon of the chain is performed, no difference between the flexibility of initial and final chains at N=Const is observed. The interrelations between structure, properties and functions of such unusual lipid chains are discussed.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОМАРКЕРОВ САМОК И САМЦОВ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS LINNE (SCORPAENIDAE)*, ОБИТАЮЩЕГО В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

И. И. Руднева¹, Н. Ф. Шевченко¹, И. Н. Залевская²

¹ Институт биологии южных морей НАН Украины, г. Севастополь, Украина,
e-mail: svg-41@mail.ru

² Таврический национальный университет, г. Симферополь, Украина

Исследовали самцов и самок морского ерша, обитающего в Стрелецкой бухте в районе Севастополя, характеризующейся высокой антропогенной нагрузкой. Не установлено существенных различий в содержании каротиноидов и показателей перекисного окисления липидов в печени обоих полов, но у самок была выше концентрация витамина А. Активность антиоксидантных ферментов крови также одинакова у обоих полов, но в сыворотке крови самцов обнаружен дополнительный компонент ($K_{эф} = 0,47-0,51$). Обсуждается вопрос о влиянии загрязнения на морфологические и биохимические показатели рыб разного пола.

Введение

Антропогенное загрязнение крайне негативно отражается на процессах репродукции рыб, непосредственно влияет на протекание гаметогенеза и формирование половых продуктов (Корниенко и др., 1998). Помимо известных фактов, констатирующих повреждающее действие ксенобиотиков на гаметогенез, икру и личинок рыб (Овен и др., 2000; Руднева, 2000), особое значение приобретают исследования действия загрязнителей на гормональную систему. Ранее нами было показано, что в гонадах рыб в значительных количествах концентрируются ксенобиотики и, в частности, ПХБ, которые модифицируют липидный состав половых желез, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние антиоксидантной системы (Руднева, Жерко, 2000). Повышенные концентрации ПХБ, ДДТ и других хлорорганических соединений (ксеноэстрогенов), химическая структура которых имеет сходство со структурой половых гор-

монов рыб, стимулируют в организме самцов синтез вителлогенина (VTG), являющегося предшественником компонентов желтка икры (Mills et al., 2000; Schreck et al., 2001; Schultz et al., 2001). Это явление отмечено у рыб, обитающих в акваториях, загрязненных сбросами сточных вод (Folmar et al., 2001; Lye et al., 1997). Появление в плазме крови самцов вителлогенина приводит к нарушениям процессов гаметогенеза, вплоть до появления бисексуальных особей и инверсии пола (Minier et al., 2000). Совершенно очевидно, что изменение гормонального статуса организма рыб под действием ксенобиотиков нарушает развитие и созревание гонад. В этом случае информативными показателями репродуктивного здоровья рыб служат биохимические параметры, характеризующие содержание половых гормонов в крови (Kokokiris et al., 2000; Roberts et al., 1999).

Вместе с тем загрязнители, содержащиеся в воде, индуцируют развитие стрессовых состояний, что усугубляет ситуацию и ослабляет здоровье рыб. В частности, происходит активация ПОЛ, продукты которых оказывают повреждающее действие на клеточные и молекулярные структуры (Владимиров, Арчаков, 1972; Руднева, 2000). При хроническом антропогенном воздействии наблюдаются ослабление иммунной системы (Coeurdacher et al., 1997), активация реакций трансформации и детоксикации ксенобиотиков (McArdle et al., 2000), морфо-физиологические изменения в популяциях рыб (Корниенко и др., 1998; Minier et al., 2000; Munkittrick, Dixon, 1989).

Принимая во внимание тот факт, что в случае тотального загрязнения морских акваторий прежде всего страдает репродуктивная система гидробионтов, интерес представляет сравнить некото-

рые биохимические параметры рыб и их зависимость от пола. Это позволит выяснить различия в процессах адаптации рыб к действию антропогенных факторов и использовать эту информацию в мониторинговых и популяционных исследованиях (Balk et al., 1996). С этой целью задачей данной работы явилось изучение морфологических и биохимических характеристик самок и самцов морского ерша, обитающего в прибрежной части в районе Севастополя.

Материалы и методы исследований

Материалом исследования служил морской ерш *Scorpaena porcus*, отловленный в Стрелецкой бухте в районе Севастополя в весенне-летний период 1998–2002 годов. Анализировали размерно-массовый состав рыб разного пола, стадию зрелости гонад рыб (Правдин, 1966). Кровь рыб отбирали пастеровской пипеткой из хвостовой артерии, отстаивали на холоду для получения сыворотки. Эритроциты после гемолиза в дистиллированной воде (соотношение 1:5) использовали для определения активности антиоксидантных ферментов.

Активность ферментов определяли спектрофотометрическими методами на спектрофотометре Specol 211 (Овен и др., 2000; Rudneva, 1997). Электрофорез белков сыворотки крови проводили в 7%-ном полиакриламидном геле (Davis, 1971). Белки окрашивали суданом черным в 7%-ной уксусной кислоте. Стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры) рассчитывали на основании коэффициента относительной электрофоретической подвижности фракций Кэф (Соркина, Руднева, 1976). Сравнение проводили как между стандартными ЭФ-спектрами, так и между статистическими показателями фракционного состава белков в ЭФ-спектрах.

Липиды печени экстрагировали смесью гексан:изопропанол в соотношении 2:1 на холоду (Верболович и др., 1989). Анализ содержания гидроперекисей липидов проводили по Каган и др. (1986), концентрацию ТБК-реактивных продуктов – по Стальной и Гаришвили (1977), содержание каротиноидов и витамина А – по Карнаухову и Федорову (1988). Статистическую обработку результатов проводили по Лакину (1990).

Результаты и их обсуждение

Стрелецкая бухта, расположенная в районе Севастополя, подвергается значительному ан-

тропогенному воздействию. Здесь находится сток ливневой канализации, кроме того, ежегодно в бухту сбрасывается 350 м³ сточных вод. Согласно данным Государственной инспекции охраны Черного моря, в воде бухты содержится 0,15–0,08 мг/л нефтепродуктов, 0,009 мг/л СПАВ, 0,07 мг/л железа, БПК₅ составило 2,9 мг/л. Совершенно очевидно, что хроническое загрязнение акватории отразилось и на жизнедеятельности ее обитателей и, прежде всего, на рыб, живущих здесь постоянно.

Результаты исследований позволили установить, что соотношение самок и самцов морского ерша составило 1:1,4. Размеры и масса рыб приведены в таблице 1. Длина рыб варьировала незначительно (CV 17,4–19,2 для самок и 13,3–13,9 для самцов), а масса изменялась в большей степени (CV соответственно выше – 53,3–58,5 и 53,6–58,7). Длина и масса самок морского ерша несколько превосходит длину самцов.

Таблица 1. Размерно-массовый состав морского ерша ($M \pm m$), обитающего в бух. Стрелецкой (Черное море, район Севастополя)

Параметры	Самки, n=44	Самцы, n=64
Длина (L), см	$11.6-28.2$ 16.6 ± 0.7	$9.9-20.7$ 14.9 ± 1.5
Стандартная длина (l), см	$8.0-18.0$ 13.2 ± 0.7	$8.8-15.0$ 12.3 ± 0.4
Масса рыбы (P), г	$17.5-446.0$ 84.8 ± 14.5	$12.9-168.0$ 55.8 ± 5.9
Масса тушки (p), г	$15.9-318.0$ 76.9 ± 11.0	$13.0-152.6$ 47.9 ± 5.4

Известно, что белки, формирующие гонады и гаметы, синтезируются в печени. Кроме того, печень является основным органом, где происходят процессы детоксикации, в которых специализированные молекулярные системы гепатоцитов играют существенную роль в защите организма от последствий окислительного стресса. В частности, важное значение имеет содержание низкомолекулярных антиоксидантов, в частности, каротиноидов и витамина А. В то же время о состоянии свободнорадикальных процессов в данном органе можно судить по количеству продуктов ПОЛ. В связи с этим представляло интерес изучить уровень ПОЛ в печени и содержание в ней низкомолекулярных антиокислителей (табл. 2).

Уровень продуктов ПОЛ не имеет существенных различий в печени самок и самцов. Та же тенденция отмечена и для содержания каротиноидов, тогда как концентрация витамина А достоверно выше у самок по сравнению с самцами.

Таблица 2. Параметры перекисного окисления липидов и содержание антиоксидантов в печени морского ерша (M±m)

Параметры ПОЛ и содержание антиоксидантов	Самки	Самцы	Различие, р
Каротиноиды, Мкг/г липидов	3.29±0.27	2.98±0.18	Н/д
Витамин А, Мг/100 г липидов	8.64±0.49	5.16±0.86	<0.05
Гидроперекиси липидов, мкг иода/мг липидов	8.97±1.15	9.71±0.41	Н/д
ТБК-реактивные продукты, нмоль/мг липидов	9.35±1.30	8.36±0.85	Н/д

Примечание: н/д – различие недостоверно.

Так как ксенобиотики попадают в организм из окружающей среды прежде всего в кровь и разносятся с ее током (иногда в комплексе с сывороточными белками) в различные органы, представляло интерес выяснить особенности состояния активности ферментной антиоксидантной системы и электрофоретического состава белков сыворотки крови рыб в зависимости от пола. Изменение активности антиоксидантных ферментов крови рыб приведены в таблице 3.

Таблица 3. Активность антиоксидантных ферментов крови морского ерша (на мл/мин, M±m)

Ферменты	Самки		Самцы	
	Стадия III n=25	Стадия IV n=18	Стадия III n=13	Стадия IV n=45
СОД, условные единицы x 10 ²	26.45±2.41	28.15±5.3	27.41±3.44	28.91±1.89
Каталаза, мг H ₂ O ₂	12.85±1.25	9.28±1.42	15.48±2.42	13.14±1.29
Пероксидаза, оптические единицы x 10 ²	1.22±0.34	32.83±1.00	7.86±0.31	28.63±0.19
Глутатионредуктаза НАДФН, нмоль	29.24±4.90	29.72±5.74	40.21±6.77	26.54±2.53

Активность антиоксидантных ферментов в крови имеет сходство у самок и самцов морского ерша и практически не зависит от стадии зрелости. Можно отметить некоторую тенденцию увеличения активности глутатионредуктазы у самцов на стадии III как по сравнению с самками, так и по отношению к показателям самцов на стадии IV.

Среднестатистические стандартные ЭФ-спектры белков сыворотки крови также имеют сходство у самцов и самок. В то же время в ЭФ-спектрах сыворотки самцов обнаружен компонент в посттрансферриновой области (Кэф=0.47–0.51), который отсутствует в сыворотке крови самок. Существенных различий между показателями вариации фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови у самок и самцов морского ерша также не обнаружено (табл. 4). Однако следует отметить большую гетерогенность ЭФ-спектров сывороточных белков самцов по сравнению с показателями самок.

ружено (табл. 4). Однако следует отметить большую гетерогенность ЭФ-спектров сывороточных белков самцов по сравнению с показателями самок.

Таблица 4. Статистические показатели числа фракций в ЭФ-спектрах белков сыворотки крови морского ерша

Параметры числа фракций в ЭФ-спектрах	Самки n=18	Самцы n=21
Пределы числа фракций в ЭФ-спектрах	9–18	11–17
Среднее число фракций в ЭФ-спектрах, M±m	15.0±0.9	4.2±0.6
Количество вариантов ЭФ-спектров по числу фракций в них	6	7
Коэффициент вариации, CV,%	16.7	18.1
Число «редких» вариантов, % к общему числу фракций	21.1	23.8
Пределы электрофоретической подвижности	0.00–1.02	0.00–1.06

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили установить, что между самками и самцами морского ерша существуют определенные различия, которые в наибольшей степени проявляются в период созревания гонад и нереста. Известно, что в печени самок рыб происходит синтез белков желтка икры (в том числе вителлогенина), которые затем попадают в кровь и доставляются в гонады для формирования икринок (Fujita et al., 1998). Кроме того, в печени аккумулируются каротиноиды, поступающие из пищи, и синтезируется витамин А. Эти компоненты также необходимы для формирования гонад и икры. Одновременно в печени самок установлено большее по сравнению с самцами содержание витамина А, тогда как уровень каротиноидов одинаков в печени обоих полов. Ранее нами было отмечено, что содержание витамина А и антиоксидантная активность липидов в гонадах самок также выше, чем у самцов, но концентрация каротиноидов и активность антиоксидантных ферментов одинакова (Руднева, 2000)

Нами не обнаружено достоверных различий показателей ПОЛ в печени и активности антиоксидантных ферментов в крови самок и самцов морского ерша. Можно предположить, что в условиях загрязнения среды обитания, которой является Стрелецкая бухта, существенных различий в ответных реакциях самок и самцов рыб на хроническое антропогенное воздействие нет. Сходные результаты были получены нами на разных видах черноморских рыб (Руднева, Скуратовская, 2009) и другими исследователями при изучении показателей ПОЛ в клетках гепатоцитов самцов и самок камбалы при действии на них различных ксенобиотиков в экспериментальных условиях (Winzor et al.,

2001). В то же время воздействие некоторых хлороорганических соединений позволяло выявить дифференцированный ответ показателей ПОЛ в клетках печени самцов и самок, и был сделан вывод, что нельзя исключать возможности модуляции путей детоксикации ксенобиотиков в печени в зависимости от пола. Было показано, что опухоли печени у самок камбалы встречаются чаще, чем у самцов (Landwust et al., 1996).

Дополнительную информацию о состоянии организма могут дать исследования белкового состава сыворотки крови. Сывороточные белки обладают способностью образовывать комплексы с ксенобиотиками, что приводит к их модификации и изменению белковых электрофоретических спектров, перераспределению компонентов и их соотношения (Львов, Гераскин, 1998). Кроме того, в кровь попадают гормоны, обеспечивающие нормальный процесс репродукции или же свидетельствующие о его нарушении (Folmar et al., 2001). Так например, появление в сыворотке крови самцов рыб, обитающих в загрязненных акваториях, вителлогенина, является следствием существенной деструкции репро-

дуктивного процесса (Schreck et al., 2001; Schultz et al., 2001). Одновременно отмечено снижение ГСИ, появление бисексуальных особей и инверсии пола (Minier et al., 2000). В наших исследованиях в сыворотке крови рыб установлена дополнительная фракция в ЭФ-спектрах сыворотки самцов, что может быть также связано с определенными модификациями сывороточных белков самцов в результате длительного антропогенного воздействия. Показатели вариации числа фракций существенно не различаются у обоих полов, но у самцов отмечена тенденция к их увеличению.

На основании представленных данных можно заключить, что в процессе репродукции у самок и самцов морского ерша наблюдаются определенные различия как в размерно-массовых характеристиках, так и в белковых спектрах сыворотки крови, которые в основном обусловлены различием в метаболизме разных полов при созревании гонад. В то же время нельзя исключить модифицирующего действия антропогенного загрязнения на морфо-физиологические и биохимические показатели разнополых рыб.

Литература

Верболович В. П., Подгорный Ю. М., Теплова Л. Л., Куркаев Р. М. Экстракция липидов для количественной комплексной оценки свободнорадикального окисления // Лабор. Дело. 1989. 12, С. 57–59.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972.

Каган В. Е., Орлов А. И., Пришпко Л. Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. // Итоги развития науки и техники. Сер. биофизика. М.: ВИНТИ. 1986.

Карнаухов В. Н., Федоров Г. Г. Методы определения содержания каротиноидов и витамина А в тканях животных. Методические рекомендации. Пущино. 1982. С. 15–18.

Корниенко Г. Г., Кожин А. А., Воловик С. П., Макаров Э. В. Экологические аспекты биологии репродукции. Ростов-на-Дону. Из-во «Эверест». 1998. С. 8–17.

Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 250 с.

Львов В. Л., Гераскин П. П. Электрофоретический состав сывороточных белков самок себрюги в условиях загрязнения Каспийского моря // 42 научная конф. профессорско-преподавательского состава Астрахань. 1998. С. 24.

Овен Л. С., Руднева И. И., Шевченко Н. Ф. Ответные реакции черноморского ерша *Scorpaena porcus* на антропогенное воздействие // Вопросы ихтиологии. 2000. Т. 40. № 1. С. 75–78.

Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая Промышленность. 1966.

Руднева И. И. Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря. // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва, МГУ. 2000.

Руднева И. И., Жерко Н. В. Действие полихлорированных бифенилов на антиоксидантную систему и перекисное окисление липидов в гонадах черноморской скорпены *Scorpaena porcus* // Экология. 2000. № 1. Р. 70–73.

Руднева И. И., Скуратовская Е. Н. Половые особенности активности антиоксидантных ферментов некоторых прибрежных видов рыб Черного моря. // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49, № 1 С. 125–128.

Соркина Д. А., Руднева И. И. Сравнительная характеристика белковых и липопротеидных спектров сыворотки крови черноморских рыб. // Молекулярная биология и медицинская генетика. Труды КМИ. 1976. 66. № 1. С. 61–63.

Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1977.

Balk L., Larsson A., Forlin L. Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances // Marine Environmental Research. 1996. V. 42, N 1–4. P. 203–208.

Coeurdacher J.L., Ppepin J.F., Fauvel C., Legall P., Bourmaud A.F., Romestand Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum* // Fish and Shellfish Immunology. 1997. V. 7. N 3. P. 151–160.

Davis B.J. Disk electrophoresis. ii. Method and application in human serum proteins. // Ann. New York Acad. Sci. 1964. V. 121. P. 404.

Folmar L.C., Gardner G.R., Schreiber M.P., Magliulo-Cepriano L., Mills L.J., Zaroogian G., in male summer flounder *Paralichthys dentatus* // Aquatic Toxicology. 2001. V. 51, n 4. P 431–441.

Fujita T., Takemura A., Takano K. Immunochemical detection of precursor proteins of yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus*.// J. Fish Biol. 1998. V. 52, N 5. P. 1229–1240.

Kokokiris L., Mourot B., Menn F.L., Kentouri M., Fostier A. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pargus pargus* (*Teleostei, Sparidae*) // Fish Physiology and Biochemistry. 2000. V. 23, N 1. P. 1–11.

Landwust C.V., Holst S., Moller H., Anders K., Momme M. Fischkrankheiten in der Nordsee, Umwelybundesamt Nr.106 03 900, UBA Texte 57/96, ISSN 0722-186X, Umweltbundesamt Berlin. 1996. P. 1–557.

Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., McCormic D. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works // Mar. Pollution Bull. 1997. V. 34, N 1. P. 34–41.

McArdle M., Elskus A., McElroy A., Larsen B., Benson W., Schlenk D. Estrogen CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent // Marine Environmental Research. 2000. V. 50. P. 175–179.

Mills L.J., Gutjahr-Gobell R.E., Haebler R.A., Borsay Horowitz D.J., Jayaraman S., Pruell R.J., McKinney R.A., Gardner G.R., Zaroogian G.E. Effects of estrogenic (o,p'-DDT; octylphenol) and antiandrogenic (p,p'-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder *Paralichthys dentatus* // Aquatic Toxicology. 2001. V. 52, n 2. P. 157–176.

Minier C., Caltot G., Leboulanger F., Hill E.M. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions // Analysis. 2000. V. 28.n 9. P. 801- 805.

Munkitrick K.R., Dixon D.G. A holistic approach to ecosystem health assessment using fish population characteristics // Hydrobiologia. 1989. V. 188/189. P. 123–125.

Roberts S.B., Jackson L.F., King W.V., Taylor R.G., Grier H.J., Sullivan C.V. Annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation // Trans. Ann. Fish. Soc. 1999. V. 128, n 3. P. 436–445.

Rudneva I.I. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V. 118 C. N 2. P. 225–230.

Schreck C., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M. S. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. Aquaculture. 2001. V. 197 (1–4). P. 3–24.

Schultz I.R., Ozner G., Merdink J.L., Skillman A. Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17 α -ethynylestradiol // Aquatic Toxicol. 2001. V. 51, N 3. P. 305–318.

Winzer K., Winston G.W., Becker W., Van Npoorden C.J.F., Kohler A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus L.*) // Aquatic Toxicology. 2001. V. 52. P. 143–155.

MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MALE AND FEMALE OF SCORPION FISH (*SCORPAENA PORCUS*) EXPOSED IN CHRONIC ANTHROPOGENIC IMPACT

I.I. Rudneva¹, N.F. Shevchenko¹, I.N. Zalevskaya²

¹ Institute of the Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Ukraine,
e-mail: svg-41@mail.ru

² Biochemistry Department of the National Tavrichesky University, Simpheropol, Ukraine,

Males and females of scorpion fish (*Scorpaena porcus*) caught in highly polluted Streletskaia Bay (Sevastopol) were studied. Carotenoid concentrations and lipid peroxidation parameters in liver were the similar in male and female. In female vitamin A level was greater as compared with male liver. Blood

antioxidant enzyme activities were the similar in both sex also, but in male blood serum the additional protein component (Kef = 0.47–0.51) was determined. The impact of environmental stress on fish male and female morphological and biochemical parameters was discussed.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ НУКЛЕАЗ У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РЫБ

В. С. Скидченко, Р. У. Высоцкая

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Карельского научного центра РАН,
г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: amelina_violetta@mail.ru

Введение

Принцип изучения адаптивных реакций на биохимическом уровне, как известно, базируется на сопоставлении тех или иных биохимических показателей организмов под действием интересующего исследователя фактора и без его воздействия. Совершенно очевидно, что для адекватной интерпретации результатов подобного рода экспериментов необходимо иметь как можно более полное представление о протекании изучаемых метаболических процессов у данного вида в нормальных условиях. Определение тестируемых показателей у представителей разных видов рыб в естественной среде обитания позволит с большей уверенностью судить о том, являются ли обнаруженные в натурном или экспериментальном исследовании особенности биохимического ответа организмов следствием различной устойчивости видов или полов к влиянию изучаемого фактора или же выявленные закономерности обусловлены иными причинами, например, видо-, поло- или тканеспецифичностью.

Существенную роль в формировании биохимического ответа на действие того или иного «стрессора» играют лизосомы, поскольку любой патологический процесс, независимо от природы фактора, его вызвавшего, включает стадию деструкции клеточных структур с участием лизосомальных гидролитических ферментов (Покровский, Тутельян, 1976; Kaushik, Cuervo, 2006; He, Klionsky, 2009). В связи с этим, неудивительно, что различные параметры, связанные с функциями самих лизосом или их ферментативного аппарата, активно используются в качестве индикаторов состояния организма в различных экологических исследованиях (Высоцкая, Сидоров, 1981; Высоцкая, Руоколайнен, 1993;

Чекунова, Фролова, 1986; Высоцкая, Немова, 2008; Kohler et al., 2002; Marigomes, Baybay-Villacorta, 2003; Moore et al., 2006). Лизосомы присутствуют во всех клетках животных, за исключением, быть может, зрелых эритроцитов. Однако количественные и качественные характеристики лизосомальных ферментов в разных органах могут варьировать, в связи с дифференциацией клеток высокоразвитых организмов и приобретением лизосомами, помимо внутриклеточного пищеварения, дополнительных функций, таких как, макрофагия, кринофагия, участие в апоптозе и иммуногенезе и др. (Покровский, Тутельян, 1976; Покровский, Крыстев, 1977; Ferri, Kroemer, 2001; Eskelinen, Saftig, 2006; Kaushik, Cuervo, 2006).

Одними из важнейших лизосомальных гидролаз являются ферменты деполимеризации нуклеиновых кислот – нуклеазы. Нуклеазы с максимальной активностью при кислых значениях pH осуществляют катаболизм нуклеиновых кислот, являющийся важной составляющей многих физиологических и биохимических процессов. В последние десятилетия в научной литературе был опубликован ряд работ, рассматривающих возможность использования лизосомальных нуклеаз в биомониторинге состояния морских и пресноводных экосистем (Попов и др., 2003; Мензорова, Рассказов, 1999; Корнеева, 1996; Коничев и др., 2005; Цветков, Попов, 2006; Мензорова, Рассказов, 2007; Высоцкая, Немова, 2008; Попов и др., 2008). В качестве индикаторных показателей предлагается как общий уровень ферментативной активности нуклеаз в различных органах гидробионтов, так и состав изоформ ферментов.

Исходя из сказанного выше, целью данной работы было исследование тканевого распределение активности кислых нуклеаз в различных органах и тканях рыб.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись рыбы, выловленные в 2000–2005 гг. из ряда относительно

чистых водоемов Карелии и Мурманской области, традиционно используемых в Лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского НЦ РАН в качестве контрольных (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика материала исследования (n – количество особей)

Вид	Год	Водоем	Пол, стадия зрелости гонад	Вес (г)	Размер (AD, мм)	n
Судак	2005	оз. Сямозеро	♀1–2	575±28	367±18	13
Лещ	2005	оз. Сямозеро	♀1–2	572±29	302±15	9
			♂1–2	417±21	274±19	3
Окунь	2004	оз. Уросозеро	♀2	91±4	173±8	12
			♂2	88±5	171±9	23
Ряпушка	2004	оз. Сямозеро	♀2–3	69±3	18±2	10
			♂3	70±4	17±3	4
Сиг	2004	оз. Раякоски	♀2	142±8	21±4	16
			♂2	220±11	25±2	10
Щука	2004	оз. Раякоски	♀2	358±28	33±6	7
			♂2–3	394±19	33±8	8
Треска	2000	открытая акватория Белого моря	♀2	73±4	195±5	5
			♂1–2	84±4	206±11	4
Навага	2001	открытая акватория Белого моря	♀2	59±3	183±9	9
			♂1	50±3	176±8	7

Всего было исследовано 6 видов пресноводных (щука *Esox lucius*, окунь *Perca fluviatilis*, судак *Lucioperca lucioperca*, сиг *Coregonus lavaretus*, ряпушка *Coregonus albula*, лещ *Abramis brama*) и 2 вида морских рыб (навага *Eleginus navaga*, треска *Gadus morhua*).

Рыбу отлавливали сетями в летний период. Органы рыб препарировали, промывали охлажденным физиологическим раствором от крови, замораживали и хранили биологические образцы в состоянии глубокой заморозки до начала анализа. С целью нивелирования индивидуальных различий изучаемых биохимических показателей использовали сборные пробы. Анализ проводили не менее, чем в 3-х сборных образцах. Активность ферментов определяли в печени, жабрах, гонадах, почках и мышцах рыб. Ткани рыб гомогенизировали с помощью цилиндрического гладкостенного гомогенизатора типа Поттера-Эльвейма с тефлоновым пестиком в 9-кратном объеме 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4), содержащего 0,001 М ЭДТА и неионный детергент Тритон X-100 (0,1%). Полученный гомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 4 °С при 10 000 g. Супернатант использовали для анализа.

Активность кислых нуклеаз определяли спектрофотометрическими методами: ДНКазы (КФ 3.1.4.6) – по методу А. А. Покровского с соавт. (1968), РНКазы (КФ 3.1.4.23) – по А. П. Левицкому и др. (1973) с некоторыми модификациями. Принцип данных методик заключается в измерении прироста низкомолекуляр-

ных продуктов гидролиза нуклеиновых кислот, характеризующихся максимумом поглощения при 260 нм (Баррет, Хит, 1980). В качестве субстратов использовали 0,1%-ные растворы соответствующих нуклеиновых кислот на ацетатном буфере, рН 5,2 для рибонуклеиновой кислоты и 5,0 для дезоксирибонуклеиновой. Активность нуклеаз выражали в условных единицах ΔE_{260} в 1 мин на 1 г сырого веса ткани.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных позволяет отметить несколько тенденций в тканевом распределении активности лизосомальных нуклеаз. В целом, соотношение уровня дезоксирибонуклеазной и рибонуклеазной активности в кислой области рН в различных органах совпадает (табл. 2 и 3). Максимальная активность лизосомальных нуклеаз присуща активно метаболизирующим органам, таким как, печень и почки. Несколько ниже, но также достаточно высокая нуклеазная активность лизосом отмечена в жабрах рыб. Наименьшей активностью характеризуется мышечная ткань. Особенно высокий уровень активности лизосомальных ДНКазы и РНКазы отмечается в гонадах половозрелых самцов.

Активность кислой ДНКазы (табл. 2), как правило, несколько ниже, чем рибонуклеазы (табл. 3) в том же органе отдельного вида рыб. В печени и жабрах рыб уровень активности ли-

зосомальной ДНКазы у самцов был достоверно ниже по сравнению с самками у всех видов, за исключением трески *G. morhua*. Для рибонук-

леазной активности такой однозначности при анализе различий показателей самцов и самок не выявлено.

Таблица 2. Активность кислой ДНКазы в органах разных видов пресноводных и морских рыб (в ΔE_{260} на 1 г ткани в 1 мин при 30 °С)

Вид	Пол	Печень	Жабры	Гонады	Мышцы	Почки
Судак	♀	1,230±0,062	0,800±0,040	0,760±0,038	0,310±0,016	
Лещ	♀	0,920±0,046	0,720±0,036	0,700±0,035	0,240±0,012	1,420±0,71
	♂	0,770±0,039	0,820±0,041	0,340±0,017	0,300±0,015	1,120±0,056
Окунь	♀	1,006±0,050	0,613±0,031	0,796±0,040	0,313±0,016	0,683±0,034
	♂	1,090±0,055	0,539±0,027	1,372±0,069	0,296±0,015	0,862±0,043
Ряпушка	♀	0,511±0,026	0,471±0,024	0,618±0,031	0,238±0,012	
	♂	0,400±0,020	0,280±0,014	0,413±0,021	0,218±0,011	
Сиг	♀	0,879±0,044	0,854±0,043	0,428±0,021	0,283±0,014	
	♂	0,724±0,036	0,460±0,023	1,017±0,051	0,350±0,017	
Щука	♀	0,986±0,049	0,465±0,023	0,894±0,045	0,413±0,021	
	♂	0,619±0,031	0,528±0,026	0,516±0,026	0,395±0,020	
Треска	♀		0,260±0,013		0,283±0,014	
	♂	0,689±0,034	0,363±0,018		0,266±0,013	
Навага	♀	0,789±0,039	0,443±0,022	0,799±0,040	0,340±0,017	
	♂	0,826±0,041	0,436±0,022		0,333±0,017	

Таблица 3. Активность кислой РНКазы в органах разных видов пресноводных и морских рыб (в ΔE_{260} на 1 г ткани в 1 мин при 30 °С)

Вид	Пол	Печень	Жабры	Гонады	Мышцы	Почки
Судак	♀	1,810±0,091	1,600±0,080	0,750±0,038	0,400±0,020	
Лещ	♀	1,320±0,066	1,110±0,056	0,740±0,037	0,280±0,014	1,990±0,100
	♂	1,080±0,054	1,330±0,067	0,590±0,030	0,360±0,018	1,590±0,080
Окунь	♀	0,869±0,043	0,613±0,031	0,666±0,033	0,280±0,014	0,563±0,028
	♂	1,016±0,051	0,410±0,021	0,919±0,046	0,253±0,013	0,816±0,041
Ряпушка	♀	0,794±0,040	0,872±0,044	0,763±0,038	0,208±0,010	
	♂	1,057±0,053	0,210±0,010	0,330±0,016	0,175±0,009	
Сиг	♀	1,419±0,071	0,789±0,039	0,756±0,038	0,431±0,022	
	♂	1,324±0,066	0,769±0,038	0,766±0,038	0,453±0,023	
Щука	♀	1,156±0,058	0,504±0,025	1,258±0,063	0,339±0,017	
	♂	0,814±0,041	0,599±0,030	0,481±0,024	0,389±0,019	
Треска	♀		0,283±0,014		0,213±0,011	
	♂	0,683±0,034	0,483±0,024		0,235±0,012	

Установленные закономерности распределения активности кислых РНКазы и ДНКазы в тканях рыб обнаруживают значительное сходство с количественным соотношением лизосом в исследованных тканях, описанным в литературе для разных объектов (Покровский, Тутельян, 1976; Покровский, Крыстев, 1977). Различие в содержании лизосом в тканях и органах, обнаруженное как путем непосредственного наблюдения в гистологических препаратах, так и по активности маркерного фермента этих органелл – кислой фосфатазы, связано со специализацией функций клеток в сложноорганизованных многоклеточных организмах (Покровский, Тутельян, 1976; Покровский, Крыстев, 1977; Высоцкая, 1999). Варьирует не только количество самих лизосом, но и их ферментный состав. Однако обе кислые нуклеазы

всегда присутствуют в первичных лизосомах (протолизосомах) – вновь образованные органеллы, еще не вовлеченные в процесс переваривания каких-либо веществ (Покровский, Тутельян, 1976). Поэтому в отсутствии специфических влияний, способных в значительной мере модулировать лизосомальную нуклеолитическую активность, есть все основания полагать, что наблюдаемый уровень активности ферментов при нормальном метаболизме обусловлен, главным образом, количеством лизосом в исследуемых тканях.

Печень является чрезвычайно важным для жизнедеятельности полифункциональным органом. Практически все вещества (нутриенты, микроэлементы, ксенобиотики), тем или иным путем поступающие в организм, подвергаются химическим преобразованиям в печени и перерас-

пределяются по органам и тканям. В том числе, именно в печени происходят основные процессы детоксикации чужеродных соединений. Во всех этих процессах участвуют кислые гидролазы, притом, их роль не сводится только, непосредственно, к гидролизу экзогенных веществ, они также выполняют и ряд вспомогательных функций. В частности, высокая интенсивность и многообразие выполняемых гепатоцитами функций сопряжены с частыми перестройками метаболического аппарата, сопровождающихся дифференциальной активацией клеточного генома для обеспечения синтеза новых структурных и каталитических белков. При этом вовлечение кислых нуклеаз обеспечивает реутилизацию отработанных матриц белков (мРНК), рибосом, тРНК цитоплазмы.

Кроме того, у костистых рыб в печени рассеяны участки экзокринной ткани панкреаса (Аmineва, Яржомбек, 1984), поэтому повышенное количество лизосом в печени и, как следствие, высокая активность лизосомальных ферментов могут быть обусловлены участием в процессах регуляции секреции – кринофагии (Покровский, Крыстев, 1977; Vitensky, 1978).

Высокая активность исследуемых ферментов, отмеченная в почках, и в меньшей степени в жабрах, связана, в первую очередь, с экскреторной функцией этих органов. Известно, что лизосомы вовлечены в систему эндоцитозного трансмембранного переноса макромолекул, не способных проходить через клеточные мембраны путем простой диффузии в силу большого размера или нерастворимости в липидах (Геннис, 1997). Судьба эндоцитированных веществ в клетке может быть различной. Часть везикул проходит сквозь эпителиоциты нефрона в неизменном виде, но значительно большая их часть соединяется с лизосомами, где подвергается ферментативному расщеплению, что обеспечивает возвращение в клеточный пул ценных веществ. Продукты гидролиза, подлежащие выведению из организма, экзцитируются в просвет почечных канальцев (Youson, 1975).

У некоторых видов рыб, в отсутствие костного мозга, почки могут служить еще и кроветворным органом (Говядинова и др., 2000). Значительная роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, а также апоптотической элиминации лишних клеток принадлежит нуклеазам лизосом (Torriglia et al., 1998; Evans, Aguilera, 2003; Griffiths, 2003; Kirkegaard, Jättelä, 2009).

Особенно высока активность кислых нуклеаз в гонадах самцов на поздних стадиях зрелости, что связано с участием лизосомальных ферментов в процессах сперматогенеза и оплодотворения (Нечаевский, Иванов, 1995; Высоцкая, 1999; Позднякова и др., 2003). По мере созревания половых продуктов у самцов происходит синтез большого количества лизосомальных гидролаз, которые концентрируются в специфическом органеиде сперматозоида – акросоме. Главное назначение этих высокоактивных катаболических ферментов в сперматозоидах заключается в разрушении оболочек яйцеклетки при оплодотворении (Barrett, Heath, 1977).

Интересную теорию, объясняющую необходимость большого количества ферментов с нуклеазной активностью в сперматозоидах, характеризующихся, помимо повышенной гидролитической активности, высокой степенью индуцибельности при неблагоприятных внешних воздействиях, предложили американские генетики (Ward, Ward, 2004). Так, при экспонировании половых продуктов в стрессовых условиях, в клетках сперматозоидов наблюдали активную фрагментацию ДНК. По мнению авторов, в таких условиях высокий нуклеолитический потенциал семенников имеет защитное значение, не допуская к оплодотворению сперматозоиды с нарушенным генетическим материалом.

В яичниках рыб активность нуклеаз значительно ниже, чем в семенниках, но также достаточно высока. Это, вероятно, объясняется важностью запаса кислых гидролаз в половых продуктах для обеспечения эндогенного питания эмбриона на ранних стадиях развития, когда основными источниками пластического материала являются белки и нуклеиновые кислоты, запасенные в оогенезе (Нейфах, Тимофеева, 1977; Высоцкая, 1999).

Более высокая рибонуклеазная активность, по сравнению с ДНКазной, по всей видимости, обусловлена большей интенсивностью метаболизма РНК, чем ДНК в нормальных клетках.

Необходимо отметить, что сравнение биохимических показателей у разных видов рыб затруднено широкой вариабельностью активности ферментов в зависимости от физиологического состояния организма, стадии жизненного цикла, влияния различных факторов среды обитания (Высоцкая и др., 1980; Немова, Высоцкая, 2004). В целом, виды, относящиеся к одному семейству, имеют сходную картину распределения нуклеазной активности в различных органах, но величины ферментативной активности различаются. Таким образом, между

положением вида рыб на эволюционной лестнице и величиной активности лизосомальных нуклеаз прямой зависимости не обнаружено.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-3731.2010.4.

Литература

Аmineva B. A., Yezhombek A. A. Физиология рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. 200 с.

Высоцкая Р. У. Лизосомальные ферменты у рыб и влияние на них природных, антропогенных и патогенных факторов. Автореф. диссер. ... д-ра биол. наук. Петрозаводск, 1999.

Высоцкая Р. У., Немова Н. Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.

Высоцкая Р. У., Руокалайнен Т. Р. Об экологической значимости лизосомальных ферментов. В сб.: Теоретические аспекты экологической биохимии. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 1993. С. 78–91.

Высоцкая Р. У., Руокалайнен Т. Р., Крупнова М. Ю. Кислые нуклеазы пресноводных рыб. В сб.: Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1980. С. 47–52.

Высоцкая Р. У., Сидоров В. С. Участие лизосомального аппарата в ответной реакции организма на воздействие антропогенных факторов внешней среды. В кн.: Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск, Карельский филиал АН СССР. 1981. С. 5–18.

Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М. Мир, 1997. 624 с.

Говядинова А. А., Ланге М. А., Хрущев Н. Г. Гемопозитические органы уникальной локализации у осетровых рыб // Онтогенез. 2000. 31. С. 440–445.

Коничев А. С., Попов А. П., Цветков И. Л., Филков П. В. Ферменты как биохимические маркеры загрязнения воды // Приложение к Вестнику МГОУ. Сер. «Естественные науки». География, экология, экономика: актуальные проблемы науки и образования. М. 2005. С. 151–153.

Корнеева Г. А. Использование ферментных тест-систем для мониторинга состояния морских вод Черного моря // Изв. РАН. Сер. биол. 1996. № 5. С. 589–597.

Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С. 192–195.

Мензорова Н. И., Рассказов В. А. Использование различных тест-систем и биохимической индикации для мониторинга экологического состояния бухты Троицы (Японское море) // Биология моря. 2007. Т. 33. № 2. С. 144–149

Мензорова Н. И., Рассказов В. А. Применение ДНКазы из эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в качестве биотеста загрязнения морской воды различными токсикантами // Биол. моря. 1999. Т. 25. № 1. С. 60–65

Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 312 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 215 с.

Нечаевский Ю. В., Иванов В. А. Кислая ДНКазы сперматозоидов вьюна *Misgurnus fossilis* L. (кандидат на роль фермента, инициирующего элиминацию клеток) // Докл. АН. 1995. Т. 343. № 4. С. 551–554.

Позднякова Ю. М., Пивненко Т. Н., Касьяненко Ю. И. Влияние эндогенных ферментов на состав олигонуклеотидов при их выделении из гонад гидробионтов // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 524–529.

Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5–59.

Покровский А. А., Крыстев Л. П. Печень, лизосомы и питание. София, 1977. 208 с.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.

Попов А. П., Коничев А. С., Цветков И. Л. Влияние токсичных соединений техногенного происхождения на активность и множественные формы кислой ДНКазы живородки речной (*Viviparus viviparus* L.) // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 518–523.

Попов А. П., Цветков И. Л., Коничев А. С. Разделение и характеристика дезоксирибонуклеаз гепатопанкреаса живородки речной в норме и при модельной интоксикации *in vitro* // Биохимия, 2008. Т. 73. Вып. 8. С. 1161–1167.

Цветков И. Л., Попов А. П. Энзимодиагностика загрязнения пресных вод с использованием кислой фосфатазы и дезоксирибонуклеазы живородки речной // Мат. Рос. школы-конференции молодых ученых «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии» (28 октября – 3 ноября 2006 г., г. Пущино). Пущино: ИБФМ РАН. 2006. С. 146–148.

Чекунова М. П., Фролова А. Д. Роль лизосом в токсикологии металлов // Структура и функции лизосом: Тез. докл. 3-го Всесоюз. симпоз. Тбилиси: ХОЗУ Минуралсибстроя СССР. 1986. С. 228–229.

Barrett A.J., Heath M.F. Lysosomal enzymes // In: Lysosomes. A laboratory Handbook. Amsterdam-N.Y.-Oxford, 1977. P. 19–145.

Bitsensky L. Lysosomes and connective tissue diseases // J. Clin. Path. V. 31. (Roy. Coll. Path. V. 12). 1978. P. 105–116.

Eskelinen E.L., Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1793. N. 4. P. 664–673.

Evans C.J., Aguilera R.J. DNase II: genes, enzymes and function // Gene. 2003. V. 322. P. 1–15.

Ferri K.F., Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways // *Nat. Cell. Biol.* 2001. Vol. 3. N. 11. P. 255–263.

Griffiths G.M. Endocytosing the death sentence // *J. Cell Biol.* 2003. V. 160. N. 2. P. 155–156.

He C., Klionsky D.J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy // *Annu. Rev. Genet.* 2009. Vol. 43. P. 67–93.

Kaushik S., Cuervo A.M. Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress // *Mol. Aspects Med.* 2006. Vol. 27. N. 5–6. P. 444–454.

Kirkegaard T., Jäättelä M. Lysosomal involvement in cell death and cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1793. N. 4. P. 746–754.

Kohler A., Wahl E., Soffker K. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.)) // *Environ. Toxicol. Chem.* 2002. V. 21. N. 11. P. 434–444.

Marigomez I., Baybay-Villacorta L. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals // *Aquat. Toxicol.* 2003. V. 64. N. 3. P. 235–257.

Moore M.N., Allen J.I., Somerfield P.J. Autophagy: role in surviving environmental stress // *Mar. Environ. Res.* 2006. Vol. 62. P. 420–425.

Torriglia A., Perani P., Brossas J.Y., Chaudun E., Treton J., Courtois Y., Counis M.F. L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor // *Mol. Cell. Biol.* 1998. Vol. 6. P. 3612–3619.

Ward M.A., Ward W.S. A model for the function of sperm DNA degradation // *Reprod. Fertil. Dev.* 2004. V. 16. N. 5. P. 547–554.

Youson J.H. Absorption and transport of ferritin and exogenous horseradish peroxidase in the opisthonephric kidney of the sea lamprey II. The tubular nephron // *Cell. Tissue Res.* 1975. V. 157. N. 4. P. 503–516.

TISSUESPECIFICITY OF LYSOSOMAL NUCLEASE ACTIVITY IN DIFFERENT FISH SPECIES

V.S. Skidchenko, R.U. Vysotskaya

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: amelina_violetta@mail.ru*

Tissue and species specificity of lysosomal nucleases activity were studied in six freshwater (pike *Esox lucius*, perch *Perca fluviatilis*, soodak *Lucioperca lucioperca*, white-fish *Coregonus lavaretus*, vendace *Coregonus albula*, bream *Abramis brama*) and two marine (navaga *Eleginus navaga*, cod *Gadus morhua*) fish species. Acid RNase () and acid DNase () activities were tested in five organs: liver, gills, gonads, kidneys

and muscles. It was shown, that in all tested fish species the maximum nucleases activity corresponded to active metabolizing organs, such as liver and kidney. Lesser, but quite high activity was observed in gills. Muscles possessed the least level of acid nucleases. Proportion of ribonuclease and deoxyribonuclease activities was the same in all tested organs without reference to fish taxonomy.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО

В. В. Слободскова, Е. Е. Солодова, В. П. Челомин

*Тихоокеанский Океанологический Институт им. В. И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток,
e-mail: slobodskovav@gmail.com*

Введение

В настоящее время все больше привлекает внимание проблема возрастающего поступления токсичных веществ в окружающую среду и последствия их воздействия на биоту. Значение загрязнения морских прибрежных акваторий обусловлено негативным влиянием ксенобиотиков на гидробионтов, действие которых проявляется только после их поглощения и накопления клеточными структурами организма (Fisher, 1995). Прибрежная зона залива Петра Великого подвержена воздействию многочисленных источников бытовых и промышленных сточных вод, в которых в большом количестве содержатся поллютанты, потенциально токсичные для биоты. Печальными примерами последствий антропогенного влияния являются бухты Золотой Рог и Диомид, Амурский залив и зал. Находка, входящие в состав зал. Петра Великого. Воды этих заливов на протяжении нескольких десятков лет поступают нефтяные, промышленные, органические и другие виды загрязнений из городов Владивосток, Находка (Галышева, 2004). Поэтому на сегодняшний день экотоксикологическая оценка состояния гидробионтов является необходимой составляющей биологического мониторинга прибрежной зоны залива Петра великого. В настоящее время в биологический мониторинг все шире вовлекаются биохимические экспресс – методы, основанные на анализе биохимических изменений, происходящих в организме при воздействии неблагоприятных факторов среды. Биохимические показатели (маркеры) могут служить для оценки раннего проявления повреждающего действия негативных факторов среды и, по своей сути, являются сигналами возникновения угрозы развития патологических процессов. Более того, такие маркеры приобретают особое значение при оценке совместного влияния различных видов антропогенного

стресса и варьирующих факторов биотического и абиотического характера, а также при прогнозировании отдаленных последствий воздействия поллютантов на экосистемы.

В случае водных беспозвоночных различными исследовательскими группами на основе лабораторных экспериментов был выявлен ряд биохимических показателей, которые могут быть использованы в качестве специфических (индикаторы воздействия определенной группы токсиантов) и неспецифических (индикаторы воздействия широкого спектра химических веществ) маркеров. Среди последних, в рамках рассматриваемой проблемы, наибольший интерес представляют показатели, характеризующие уровень повреждения ДНК, который выявляется в настоящее время с помощью метода ДНК-комет (Comet assay, SCGE) (Singh et al., 1988). Данный подход основан на определении степени повреждения ДНК (расплетание цепей, разрывы на различных участках ДНК) под воздействием негативных факторов. Влияние генотоксикантов на организм в первую очередь приводит к структурным модификациям в ДНК, впоследствии нарушая нормальное протекание клеточных процессов. Разрывы в цепях ДНК являются общим следствием действия генотоксичного агента, т.е. являются чувствительным конечным этапом разрушения. Методы количественного определения разрывов ДНК часто основаны на взаимосвязи между их образованием и скоростью появления цепей ДНК в щелочных условиях. Ранее метод применялся только в медицинских исследованиях на клетках млекопитающих, но в середине 90-х гг. стал широко использоваться в экологическом мониторинге (Nacci et al., 1996; Mitchelmore et al., 1998; Shugart, 2000; Regoli et al., 2004; Mitchelmore C.L. et al., 2004).

Основное преимущество метода заключается в его способности регистрировать повреждения на уровне отдельной эукариотической клетки, прак-

тически любого происхождения. Для анализа образца методом ДНК-комет необходимо наличие всего нескольких тысяч клеток. Также привлекает быстрота проведения экспериментов и относительная простота лабораторного протокола.

Цель нашей работы состояла в оценке генотоксичности среды обитания на степень повреждения молекулы ДНК жабрных клеток эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* методом ДНК-комет (Comet assay, SCGE).

Материалы и методы

В работе использовали половозрелых особей (размер 30–34 мм) эстуарного двустворчатого моллюска *Corbicula japonica*. Вид распространен в Японском море от Восточно – Корейского залива до западного побережья Сахалина. Обитает в солоноватых водах эстуариев рек, приморских лагун и озер, соединяющихся с морем протоками.

Отбор моллюсков проводился в устье реки Артемовка (Уссурийский залив), в устье реки Раздольная (Амурский залив) и в лагуне Лебяжья водолазным способом. Выловленных моллюсков доставляли в лабораторию в течении 2–х часов после отбора.

После 2–х дневной адаптации при температуре 16–18 °С проводили работы по изучению степени повреждения молекулы ДНК жабрных клеток *C. japonica*, обитающей в разных районах залива Петра Великого.

Жабры извлекали из моллюсков и для удаления слизи трижды промывали холодным (4 °С) изотоническим раствором, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (500 мМ NaCl, 12,5 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА-Na₂ и 20 мМ Трис – HCl, pH 7.4). Затем жабры аккуратно резали ножницами на небольшие фрагменты и помещали в 4–5 мл изотонического раствора. Через 30–40 мин. инкубации выделившиеся клетки отделяли от фрагментов жабр фильтрованием через мельничный газ с диаметром ячеек 40 мкм. Клетки, находящиеся в фильтрате, осаждали центрифугированием и перерастворяли в изотоническом растворе до концентрации 10⁵ кл./мл.

В работе использовали щелочной вариант кометного анализа (Singh et al., 1988), адаптированного к морским организмам (Mitchellmore et al., 1998). 50 мкл суспензии клеток добавляли к 100 мкл 1% легкоплавкой агарозы (ЛКВ, Швеция) в 0,04 М фосфатном буфере (pH 7.4) при 37 °С, тщательно перемешивали, наносили на предметное стекло, предварительно покрытое для лучшего

прилипания 1% раствором агарозы и накрывали покровным стеклом. Образец помещали на 3 мин в холодильник для образования геля. Покровное стекло осторожно снимали, и слайд погружали в лизирующий раствор (2.5М NaCl; 0.1М ЭДТА-Na₂, 1% Тритон X–100; 10% ДМСО; 0.02М Трис, pH 10) на 1 час в темное холодное место. После промывания холодной дистиллированной водой слайды помещали в электрофорезный буфер (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na₂) и выдерживали 40 мин. Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 15 минут. После нейтрализации (0.4М Трис-HCl, pH 7.4) слайды окрашивали этидиум бромидом (2 мкг/мл).

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений была использована компьютерная программа CometScore Freeware v1.5 (http://www.autocomet.com/products_cometscore.php), которая позволяет вычислять различные параметры комет, указывающих на степень повреждения клеточной ДНК. В работе мы определяли в каждой комете три параметра: 1) долю ДНК в хвосте кометы (%DNAt), 2) длину хвоста кометы (Lt).

В каждой группе моллюсков анализировали по 8 слайдов, содержащих не менее 50 комет в каждом. Статистическую оценку результатов проводили по каждому эксперименту путем сравнения среднегрупповых показателей ($P < 0,05$) поврежденности ДНК во всех группах моллюсков с использованием непараметрического критерия Даннета.

Результаты и обсуждение

При визуальном анализе, видно, что молекула ДНК клеток жабр *C. japonica* собранной в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья (Рис. 1а, 1б) образует симметричное яркое ядро (полость в агарозе, заполненную ДНК) и окружающее его «гало», представленное вышедшими в агарозу петлями высокополимерной ДНК. В то же время, в клетках жабр моллюсков, отобранных в устье реки Раздольная, молекула ДНК образует хорошо выраженные кометы, что, очевидно, обусловлено глубокой деградацией генома и миграцией низкополимерных фрагментов ДНК (Рис. 1с). Исходя из классификации, предложенной Коллинзом с коллегами (Collins et al., 1995), клетки жабр моллюсков обитающих в устье реки Артемовка и лагуне Лебяжья обра-

зуют кометы, которые можно отнести к двум классам C0 и C1. Нередко бывает трудно визуально обнаружить разницу между кометами этих двух классов, поэтому они объединяются в одну группу (C0/C1)-комет, характерных для неповрежденных и жизнеспособных клеток (Тронов и др., 1998). Кометы, формируемые клетками жабр корбикулы, населяющей устье реки Раздольная, можно отнести преимущественно к классу C3, что свидетельствует о высоком уровне фрагментации молекулы ДНК.

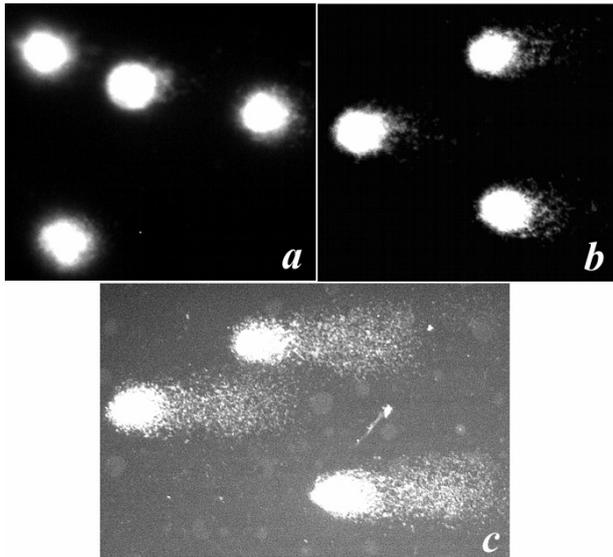


Рис. 1. Степень повреждения молекулы ДНК жаберной ткани *C. japonica* (a) эстуария реки Артемовка; (b) лагуна Лебязжья (c) эстуария реки Раздольная

В таблице приведены рассчитанные параметры полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы -%DNAt, длина хвоста кометы – Lt), отражающие степень повреждения ДНК клеток жабр моллюска (см. таблицу). Анализ этих данных показывает, что в клетках жабр моллюсков, отобранных в устье реки Раздольная, значения указанных параметров существенно выше, чем в других группах моллюсков. В тоже время обращает на себя внимание высокая вариабельность этих параметров, что свидетельствует о высокой гетерогенности всех выборок комет.

Основные параметры ДНК-комет клеток жабр моллюсков *C. japonica*, собранных в разных районах залива Петра Великого

МЕСТА СБОРА МОЛ-ЛЮСКОВ	Lt	% DNAt
р. АРТЕМОВКА	7,56±3,4	4,33±2,1
р. РАЗДОЛЬНАЯ	91,18±38,1	40,90±12,05
ЛАГУНА ЛЕБЯЖЬЯ	36,25±14,92	20,79±8,40

На диаграмме (рис. 2) приведен один из параметров полученных комет (доля ДНК в хвосте кометы -%DNAt), отражающий степень повреждения жаберной ДНК *C. japonica*, обитающей в разных районах залива Петра Великого.

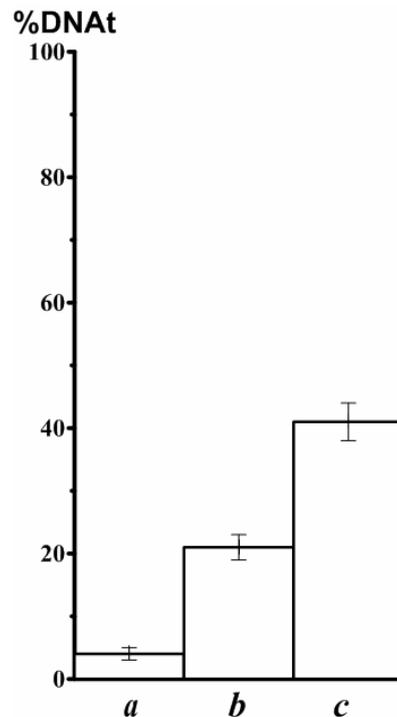


Рис. 2. Доля ДНК в хвосте комет (%DNAt) формируемых клетками жабр корбикулы, обитающей в (a) эстуария реки Артемовка ($P < 0.05$); (b) лагуна Лебязжья ($P < 0.05$); (c) эстуария реки Раздольная ($P < 0.05$)

Для наглядности, полученные экспериментальные данные, из которых были рассчитаны усредненные значения (таблица), были представлены на рисунке 3 в виде зависимости % ДНК и длиной «хвоста» кометы. Этот вид бивариантного распределения обычно используется для характеристики популяций и наглядно демонстрирует пределы значений параметров, характеризующих кометы, и их взаимосвязь. Из представленных результатов (рис. 3) особенно отчетливо видна высокая гетерогенность структуры ДНК клеток жабр моллюсков, подвергшихся неблагоприятному воздействию факторов среды (р. Раздольная). При этом доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы, в клетках моллюсков, обитающих в устье реки Артемовка и лагуна Лебяз-

жья, не превышает 10 и 12% соответственно, тогда как в клетках моллюсков, полученных из

устья реки Раздольная, этот показатель для основной массы комет составляет 40–45%.

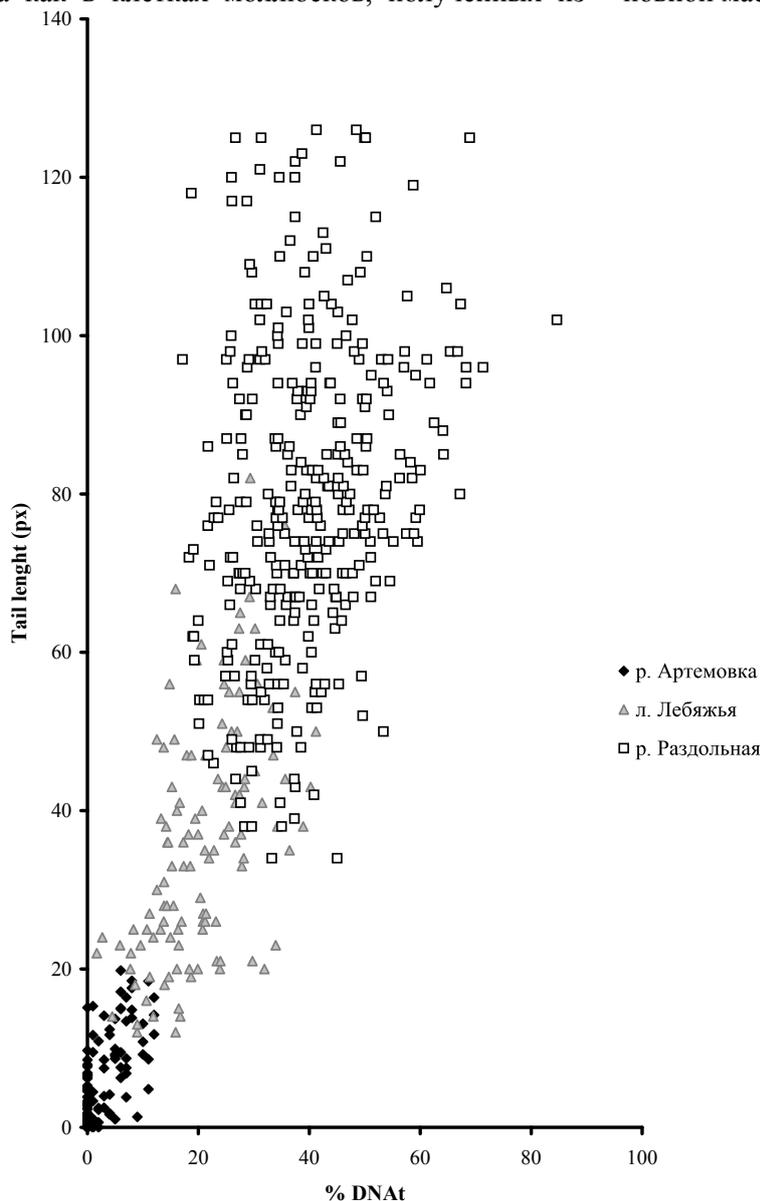


Рис. 3. Корреляция между процентом мигрированной ДНК($\%DNAt$) и длиной хвоста (Lt) комет, формируемых клетками жабр *S. japonica* собранной в размых районах залива Петра Великого

Полученные данные свидетельствуют о том, что метод ДНК-комет обладает чувствительностью для выявления повреждений молекулы ДНК, вызванных неблагоприятной средой обитания. Похожие результаты были получены и другими авторами на моллюсках (Cotelle, 1999; Wilson, 1999; Sasaki, 1997; Hamoutene, 2002; Pavlicia, 2001; Regoli et al., 2004), ракообразных (Lee, 1999; Lee, 2000), рыбах (Pandurangi, 1995; Deventer, 1996; Adb-Allah, 1999), амфибиях (Clements, 1997) полихетах (De Voeck, 1997). Это говорит о том, что метод ДНК-комет, прекрасно зарекомендовал себя в экотоксикологическом мониторинге водной среды.

Исходя из обзора имеющихся литературных данных, можно сделать вывод, что результаты нашего исследования отражают сложившуюся обстановку, по уровню загрязнения в заливе Петра Великого. Так, например река Раздольная, на сегодняшний день является одной из самых загрязненных рек в Приморском крае. Среднее течение реки находится в зоне достаточно интенсивного сельскохозяйственного возделывания земель, а нижнее подвергается мощному антропогенному прессингу: именно здесь расположены стоки коллекторов г. Уссурийск, железнодорожных предприятий, мясокомбината, сахарного завода, картонной фабрики и кожевенного комбината (Никулина, 2006; Кичу, 2008). Ока-

зывает негативное влияние на состав вод реки Раздольной и интенсивно развивающееся хозяйство северных провинций Китая, расположенных в ее верховье (Шулькин, 2005). Комплексное антропогенное воздействие отражается на состоянии гидробионтов, что наглядно демонстрируют наши результаты (рис. 1с). На микрофотографии отчетливо виден деградированный геном жаберных клеток корбикулы, населяющей этот район.

На прилегающей территории реки Артемовка в последние годы наблюдается спад производства, в связи с чем, уровень загрязнения в реке снизился (Кику, 2008; Нигматулина, 2008). И по нашим результатам, можно сделать вывод, что состояние вод реки Артемовка улучшилось, т.к. по данным кометного анализа генотоксических эффектов не наблюдается (рис. 1а).

Лагуна Лебяжья, находится в отдаленном районе залива Петра Великого, где исключено сильное антропогенное воздействие на водную экосистему. Данный регион характеризуется отсутствием промышленности и считается одним из самых незагрязненных районов залива Петра Великого. Наши данные свидетельствуют о том, что при отсутствии выраженной антропогенной нагрузки на водные экосистемы, клетки жабр

корбикулы образуют слабовыраженные ДНК-кометы (рис. 1б). Повреждения такого типа характерны для неповрежденных и жизнеспособных клеток.

К сожалению, мониторинг прибрежной зоны залива Петра Великого, с использованием метода ДНК-комет только начинается. Наша работа является одной из первых, в которой мы предлагаем оценить степень генотоксичности среды обитания гидробионтов этим методом. Работы такого плана, несомненно, важны, потому что, учитывая исключительную роль генома в функционировании биологической системы, повреждения в структуре молекулы ДНК относятся к наиболее важным проявлениям токсичности среды обитания. Так как длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается накоплением повреждений ДНК и угнетению системы репарации, что в свою очередь может привести к мутациям и онкогенезу.

В заключении можно отметить, что метод ДНК-комет обладает достаточной чувствительностью, необходимой для регистрации повреждений ДНК на уровне отдельной клетки и может быть применен для оценки генотоксичности водной среды залива Петра великого.

Литература

- Галышева Ю. А. Сообщества макробентоса сублиторали залива Восток Японского моря в условиях антропогенного воздействия // Биол. моря. 2004. Т. 30, № 6. С. 423–431.
- Кику Д. П., коваковдова Л. Т. Сравнительная оценка содержания микроэлементов в двустворчатых моллюсках из Уссурийского и амурского заливов // Уссурийский залив: современное экологическое состояние, ресурсы и перспективы природопользования. Материалы международной научно-практической конференции. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2009. – С. 94–98.
- Нигматулина Л. В. Сравнительная оценка поступления загрязняющих веществ со сточными водами на акваторию Амурского и Уссурийского заливов (Японское море) // Современное состояние водных биоресурсов: материалы научной конференции, посвященной 70-летию С. М. Коновалова. — Владивосток: ТИПРО-центр, 2008. — С. 595–600.
- Никулина Т. В. Оценка экологического состояния р. Раздольная по составу индикаторных видов водорослей // Вестник ДВО РАН. 2006. № 6. С. 71–78.
- Тронов В. А., Терещенко Д. Г., Конопляников М. А. Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемая методом ДНК-комет // Биофизика. 1998. Т. 43, вып. 1. С. 115–124.
- Шулькин В. М., Семькина Г. В. Сезонная и многолетняя изменчивость содержания и выноса биогенных соединений р. Раздольной (Приморский край) // Водные ресурсы. 2005. Т. 32, № 5. С. 575–583.
- Adb-Allah G. A., El-Fayoumi R. I., Smith M. J., Heckmann R. A., O'Neill K. L. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the comet assay // Mutat. Res. 1999. Vol. 446. P. 181–188.
- Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // Environ. Mol. Mutagen. 1997. Vol. 29. P. 277–288.
- Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // Mutation Res. 1995. V. 336. P. 69–77.
- Cotelle S., Ferand J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review // Environ. Mol. Mutagen. 1999. Vol. 34. P. 246–255.
- De Boeck M., Kirsch-Volders M. *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an sentinel species to assess the genotoxic risk (comet assay) of RAH exposure to the environment // Environ. Mol. Mutagen. 1997. Vol. 30. P. 82–90.
- Deventer K. Detection of genotoxic effects on cell of liver and gill of *B. rerio* by means of single cell gel

electrophoresis // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1996. Vol. 56. P. 911–918.

Fisher N.S., Reinfelder J.R. The trophic transfer of metals in marine systems // Metall speciation and bioavailability in aquatic systems. New York; London; John Wiley and Sons. 1995. P. 363–396.

Hamoutene D., Payne J. F., Rahimtula A., Lee K. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons // Mar. Environ. Res. 2002. Vol. 54. P. 471–474.

Lee R. F., Steinert S. A., Nakayama K., Oshima Y. Use of DNA damage (Comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos // Environ. Toxicol. And Risk Assess.: Stand. of Biomarkers for Endocrine Disrup. and Environ. Assess. 1999. Vol. 8. P. 341–349.

Lee R., Kim G. B., Maruya K. A., Steinert S. A., Oshima Y. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants // Mar. Environ. Res. 2000. Vol. 50. P. 553–557.

Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the «Comet» assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51–58.

Mitchelmore C.L., Hyatt S. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay // Mar. Environ. Res. 2004. Vol. 58. P. 707–711.

Nacci D.E., Cayula S., Jackim E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using

the single cell gel assay // Aquat. Toxicol. 1996. Vol. 35. P. 197–210.

Pandurangi R., Petras M., Ralph S., Vizoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp // Environ. Mol. Mutagen. 1995. Vol. 26. P. 345–356.

Pavlicia M., Kobucar G. I. V., Mojas N., Erben R., Pares D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using the comet assay // Mutat. Res. 2001. Vol. 490. P. 209–214.

Regoli F., Frenzili G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment // Aquat. Toxicol. 2004. Vol. 68. P. 167–178.

Sasaki U. F., Izumiyama F., Nishidate E., Ishibashi S., Tsuda N., Matsusaka N., Asano N., Saotome K., Sofumi T., Hayashi M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study // Mutat. Res. 1997. Vol. 393. P. 133–139.

Shugart L.R. DNA damage as a biomarker of exposure // Ecotoxicology. 2000. Vol. 9. P. 329–340.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Experimental Cell Res. 1988. Vol. 175. P. 184–91.

Wilson J. T., Pascoe P. L., Parry J. M., Dixon D. R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Plecypoda) // Mutat. Res. 1999. Vol. 399. P. 87–95.

APPLICATION OF GENOTOXIC ANALYSIS FOR MONITORING OF COASTAL ZONE OF THE PETER THE GREAT BAY

V.V. Slobodskova, E.E. Solodova, V.P. Chelomin

V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russia,
e-mail: slobodskova@poi.dvo.ru

The coastal zones of seas and oceans, where the center of the main stocks of biological resources that may be susceptible to a variety of anthropogenic factors, which have various effects on marine organisms and affects all levels of the

organization of living systems – from the molecular to the ecosystem. In connection with, the actual problem is reliable and operational ecotoxicological assessment of the relevant sea areas.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ НА СОСТОЯНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ СЕТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МОРСКИХ РЫБ

А. А. Солдатов

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина,
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

В условиях гипотермии у ряда теплолюбивых видов рыб отмечается развитие асфиксии, которая часто сопровождается гибелью посадочного материала. Эта реакция наблюдается при температурах менее 7 °С (Куликова и др. 1986; Шекк и др., 1990). В тканях происходит усиление анаэробных процессов на фоне снижения содержания аденилатов и энергетического заряда (Арсан, 1986; Гулевский и др., 2007). Данная реакция в определенной степени парадоксальна, так как развивается при снижении потребности организма в кислороде и повышении его растворимости в воде, тканевых и циркуляционных средах.

Установлено, что низкие температуры индуцируют выработку HIF-1 (hypoxia inducible factor) (Neise et al., 2006). Сравнительно недавно данный фактор был идентифицирован в плазме крови форелей (Soitamo et al., 2001). Известно, что HIF-1, наряду с другими локусами генома, экспрессируется гипоксией (Bosworth et al., 2005; Ju et al., 2007). Это означает, что гипотермия должна изменять кислородный режим тканей. Исследования, выполненные на скелетных мышцах кефали-сингиля, действительно показали, что гипотермия вызывает снижение среднемышечного напряжения кислорода, рост числа гипоксических и аноксических зон в мышечной ткани на фоне общей активизации анаэробных процессов (Солдатов, Парфенова, 2009).

Известно, что одним из наиболее эффективных механизмов коррекции тканевого PO_2 являются процессы микроциркуляции. Изменение числа функционирующих капиллярных единиц в ткани влияет на площадь диффузионной поверхности, толщину диффузионного слоя и характер распределения PO_2 (Шошенко и др., 1984). Можно предположить, что гипотермия вызывает негативные изменения в состоянии сосудистой стенки теплолюбивых рыб, что снижает

эффективность сосудодвигательных реакции в коррекции кислородного режима тканей. Проверке данного предположения и посвящена настоящая работа.

Материал и оборудование

В работе использовали взрослых особей теплолюбивой хамсы (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) и холодолюбивой тюльки (*Clupeonella cultriventris*, Nordmann, 1840) обоего пола в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад – II-III). Размерно-весовые характеристики для особей хамсы составляли 8,3–13,1 г, 8,4–12,7 см, для особей тюльки – 7,0–9,0 г, 6,3–8,1 см.

Эксперименты были выполнены в аквариумах вместимостью 1,5 м³. Контрольную группу рыб содержали при температуре воды 15±1 °С. В ходе опыта температуру снижали со скоростью 0,2 °С ч⁻¹ от 15 до 5 °С. После этого исследовали адаптацию к указанным температурам в течение 15 суток. Затем отбирали образцы тканей. В эксперименте каждой опытной группе рыб соответствовала контрольная. Образцы мышечной ткани отбирали из большой белой боковой (*musculus lateralis magnus*) и поверхностной красной боковой (*musculus lateralis superficialis*) мышц, расположенных позади спинного плавника. В момент отбора проб применяли уретановую анестезию (Солдатов, 2003).

Для выявления числа функционирующих (открытых) капиллярных единиц в скелетных мышцах рыб использовали безинъекционный метод Слонимского (Киселева и др., 1983). Он основан на реакции циркулирующих эритроцитов с бензидиновым реагентом: 2 г чистого бензидина, 20 мл раствора Рингера, 60 мл дистиллированной воды, 0,5 г активированного угля.

Реагент после приготовления встряхивают, фильтруют и хранят без доступа света.

Кусочки *m. lateralis magnus* и *m. lateralis superficialis* брали позади спинного плавника и помещали в бензидиновый реагент до появления окраски микрососудов. После этого их переносили в 3%-ный раствор перекиси водорода, а затем в 8%-ный раствор аммония молибденовокислого, который закрепляет окраску гемоглобина. Далее образцы тканей фиксировали в 80%-ном этаноле и рассекали на поперечные срезы (толщина 25–30 мкм) на замораживающем микротоме. Препараты просветляли в метиловом эфире салициловой кислоты и докрашивали гематоксилин-эозином. На срезах подсчитывали число капиллярных единиц.

Свежие пробы красных и белых мышц взвешивали на аналитических весах. Затем помещали их на кварцевое стекло и высушивали при 105 °С до постоянного веса. Органическое вещество, полученное после высушивания проб, растворяли в концентрированной HNO₃. В растворах определяли концентрацию Ca²⁺. Измерения выполняли на пламенном фотометре ПАЖ-3 с использованием смеси ацетилен-воздух.

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_x$. Значимость различий оценивали при помощи параметрического t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению среднеарифметической величины и моды.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты наблюдений, плотность капиллярной сети в мышечной ткани хамсы и тюльки при 15 °С была близкой (рис. 1). В красных мышцах она составляла соответственно 448,1±6,5 и 421,3±10,0 единиц мм⁻², а в белых 65,2±3,5 и 61,1±2,6 единиц мм⁻². Понижение температуры воды в диапазоне 5–15 °С вызывало сокращение числа функционирующих капилляров в красных мышцах хамсы на 29,7% (p<0,001), а в белых на 39,3% (p<0,001). У тюльки изменения были менее выражены. Плотность капиллярной сети в красных мышцах при 5 °С была на 17,8% (p<0,001), а в белых на 20,3% (p<0,01) ниже, чем при 15 °С.

Следует отметить, что при 5 °С особи тюльки активно перемещались в аквариуме. Подвиж-

ность же особей хамсы, напротив, была крайне ограничена. Рыбы часто зависали в толще воды. Проявлялась реакция асфиксии. Особи поднимались к поверхности и захватывали ртом воздух. Отмечались единичные случаи потери координации движений. Они выражались в покачивании тела при движении.

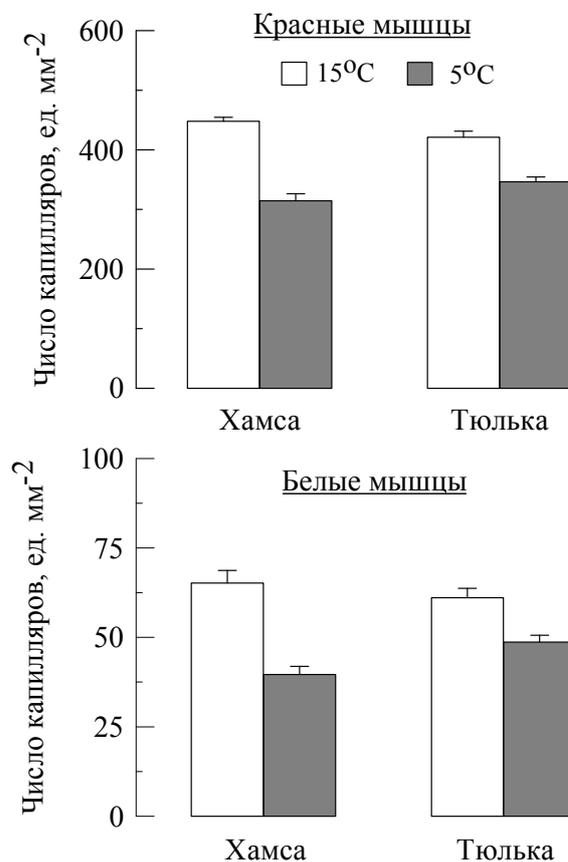


Рис. 1. Плотность капиллярной сети в скелетных мышцах хамсы и тюльки при 15 и 5 °С

Известно, что реакции перераспределения крови принимают достаточно активное участие в адаптации организма рыб к условиям среды. Наиболее выраженное действие оказывает внешняя гипоксия. В большинстве случаев она вызывает депрессорный эффект у гладкомышечной стенки сосудов многих органов (Richards et al., 1997; Olson et al., 2000; Dombkowski et al., 2006), в том числе и сосудов скелетных мышц (Schwerte et al., 2003). Это приводит к увеличению числа функционирующих капиллярных единиц.

Для проверки функциональной полноценности сосудистой сети хамсы и тюльки в условиях гипотермии был выполнен дополнительный эксперимент. Особей обоих видов помещали в гипоксические условия: в воду с концентрацией кислорода 2,6–2,7 мг л⁻¹, что соответствует 30%

насыщения от нормального. Экспозиция составила 2 часа.

При 15 °С гипоксия вызывала рост числа функционирующих капилляров в красных и белых мышцах хамсы на 34–42% ($p < 0,001$) (рис. 2). В то же время, аналогичное воздействие при 5 °С не оказывало заметного влияния на плотность капиллярной сети. В сравнении с контрольной группой различия не были статистически значимы. Утрата чувствительности к гипоксии при 5 °С, по-видимому, отражает негативное влияние гипотермии на сосудистую стенку у данного вида. В тоже время, у холо-

долюбивой тюльки при 5 °С реакция была выражена. Гипоксия вызывала увеличения числа капилляров на 46–51% ($p < 0,001$).

Анализ причин негативного эффекта гипотермии на сосудистую систему скелетных мышц теплолюбивой хамсы позволил выявить значительный рост содержания Ca^{2+} в мышечной ткани у данного вида (рис. 3). Так, при 15 °С содержание Ca^{2+} в мышцах у обеих рыб было близким – 2,5–2,9 мэкв $кг^{-1}$. При 5 °С оно повышалось, но если у тюльки рост составил только 23,6–32,2% ($p < 0,001$), то у хамсы содержание Ca^{2+} повышалось в 2,1–2,2 раза ($p < 0,001$) и достигало 5,8–5,9 мэкв $кг^{-1}$.

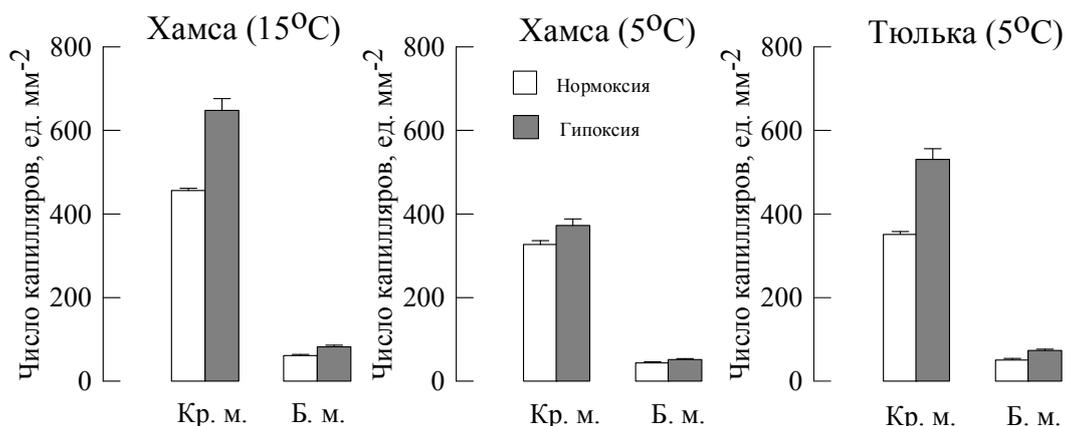


Рис. 2. Влияние внешней гипоксии на плотность капиллярной сети в скелетных мышцах хамсы и тюльки при различных температурах воды (Кр. м. – красные мышцы; Б. м. – белые мышцы)

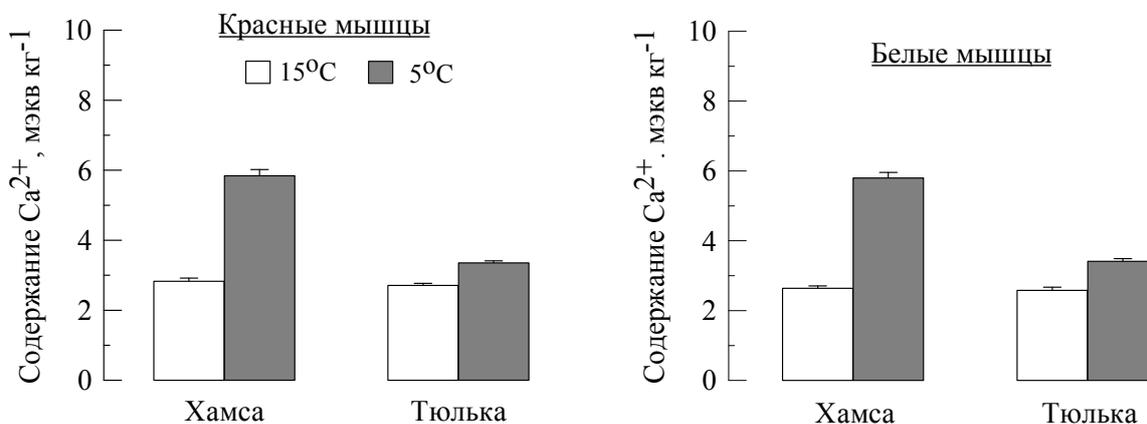


Рис. 3. Содержание Ca^{2+} в скелетных мышцах хамсы и тюльки при 15 и 5 °С

Известно, что у клеток чувствительных к гипотермии в области низких температур происходит нарушение мембранных функций, приводящее к диссипации ионных градиентов, что сопровождается входом Ca^{2+} в клетки (Ночачка, 1986). Поступление внеклеточного Ca^{2+} в гладкомышечные клетки активирует базальный тонус сосудов (Шуба, Кочемасова, 1988). Это исключает активные

вазодилататорные реакции их на тестовые нагрузки. Такой механизм развития тканевой гипоксии на основе уменьшения плотности капиллярной сети мышц при низких температурах у рыб вполне реален, если учесть, что многие из них являются типично теплолюбивыми видами. Не следует исключать из внимания и факт высокой Ca^{2+} -связывающей способности митохондрий рыб в сравнении

с теплокровными животными (Романенко и др., 1980). При этом Ca^{2+} , подавляя активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, разобщает дыхание и окислительное фосфорилирование (Арсан, 1986), что может существенно снижать энергетический статус клетки. Следует отметить, что вазоконстрикторный эффект Ca^{2+} ранее был выявлен и в условиях гипоксии у циклостомат (Olson et al., 2001; Russell et al., 2001).

Таким образом, в сравнении с холодолюбивой тюлькой капиллярная сеть скелетных мышц теплолюбивой хамсы в условиях гипотермии (5 °C) утрачивает способность реагировать на тестовые нагрузки (внешняя гипоксия). Число функционирующих капилляров не изменяется в условиях внешнего дефицита кислорода. Это связано со значительным повышением концентрации Ca^{2+} в мышечной ткани.

Литература

Арсан О. М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонного цикла в организме рыб // Гидробиол. ж. – 1986. – Т. 22, N 3. – С. 57–62.

Арсан О. М. Участие Ca^{2+} в регуляции процессов гликолиза и трикарбонного цикла в тканях карпа при различном температурном режиме водной среды // Гидробиол. ж. – 1986. – Т. 22, N 5. – С. 71–74.

Гулевский А. К., Релина Л. И., Жегунова Е. Г. и др. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 1. – С. 64–70.

Киселева А. Ф., Житников А. Я., Кейсевич Л. В. и др. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии. – Киев: Здоров'я, 1983. – 168 с.

Куликова Н. И., Шекк П. В., Руденко В. И. Об отношении молоди черноморских кефалей к низкой температуре // Вопр. ихтиол. – 1986. – Т. 26, Вып. 1. – С. 119–128.

Романенко В. Д., Евтушенко Н. Ю., Коцарь Н. И. Метаболизм углекислоты у рыб. – Киев: Наук. думка, 1980. – 180 с.

Солдатов А. А. Физиологические аспекты действия уретанового наркоза на организм морских рыб // Гидробиол. журн. – 2003. – Т. 39, N 1. – С. 51–63.

Солдатов А. А., Парфенова И. А. Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии // Проблемы криобиологии. – 2009. – Т. 19, № 3. – С. 290–300.

Шекк П. В., Куликова Н. И., Руденко В. И. Возрастные изменения реакции черноморского сингиля *Liza aurata* на низкую температуру // Вопр. ихтиол. – 1990. – Т. 30, Вып. 1. – С. 94–106.

Шошенко К. А., Баранов В. И., Брод В. И., Вязовой В. В., Голубь А. С., Иванова С. Ф., Нешумова Т. В. Органное кровоснабжение и особенности кислородного транспорта в мышцах // Исслед. энергетики движения рыб. – Новосибирск: Наука, 1984. – С. 78–115.

Шуба М. Ф., Кочемасова Н. Г. Физиология сосудистых гладких мышц. – Киев: Наукова думка, 1988. – 252 с.

Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic

exposure // Proteomics. – 2005. – Vol. 5, N 5. – P. 1362–1371.

Dombkowski R.A., Doelman M.M., Head S.K., Olson K.R. Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209, Pt 16. – P. 3234–3240.

Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. – 2006. – Vol. 143, N 4. – P. 494–503.

Hochachka P. Defence strategies against hypoxia and hypothermia // Science. – 1986. – Vol. 231. – P. 324–241.

Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2007. – Vol. 145, N 1. – P. 134–144.

Olson K.R., Forster M.E., Bushnell P.G., Duff D.W. Spontaneous contractions in elasmobranch vessels *in vitro* // J. Exp. Zool. – 2000. – Vol. 286, N 6. – P. 606–614.

Olson K.R., Russell M.J., Forster M.E. Hypoxic vasoconstriction of cyclostome systemic vessels: the antecedent of hypoxic pulmonary vasoconstriction? // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – Vol. 280, N 1. – P. R198–R206.

Richards G.P., Liang Y.M., Chao J., Chao L. Purification, characterization and activation of fish muscle prokallikrein // Comp. Biochem. Physiol. – 1997. – Vol. 118C, N 1. – P. 39–48.

Russell M.J., Pelaez N.J., Packer C.S., Forster M.E., Olson K.R. Intracellular and extracellular calcium utilization during hypoxic vasoconstriction of cyclostome aortas // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2001. – Vol. 281, N 5. – P. R1506–R1513.

Schwerte T., Uberbacher D., Bernd P. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic condition *in vivo* // J. Exp. Biol. – 2003. – Vol. 206. – P. 1299–1307.

Soitamo A.J., Raabergh C.M.I., Gassmann M. et al. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1) from Rainbow Trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 23. – P. 19699–19705.

EXPERIMENTAL HYPOTHERMIA INFLUENCE ON THE CAPILLARY NETWORK STATE OF MARINE FISHES SKELETAL MUSCLES

A.A.Soldatov

Institute of Biology of the Southern Seas of Ukrainian National Academy of Science, Sevastopol
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

Influence of low temperatures on a capillary network state in skeletal muscles heat- and cold-loving species of marine fishes: *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) and *Clupeonella cultriventris* (Nordmann, 1840) accordingly were investigated in experimental conditions. Control group of fishes contained at 15 ± 1 °C. During experiment temperature decreased with a rate $0,2$ °C h^{-1} from 15 up to 5 °C.

Exposition – 15 days. It was shown, that the capillary network of skeletal muscles heat-loving *En. encrasicolus* loses ability to react to test loadings (external hypoxia) at 5 °C in comparison with cold-loving *Cl.cultriventris*. The number of functioning capillaries does not change in conditions of oxygen external deficiency. It is connected to substantial increase of Ca^{2+} concentration in a muscle tissue.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ ВОД ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА НА СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ МУСКУЛАТУРЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ

И. В. Суховская, Е. В. Борвинская, Л. П. Смирнов

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: levps@rambler.ru

Введение

В последние десятилетия во многих странах уделяется большое внимание фундаментальным и прикладным исследованиям влияния факторов загрязнения окружающей среды на организм человека и животных (под ред. Ивановой, 1983).

Антропогенное воздействие на экосистемы, в том числе и на водные, постоянно усиливается, что вызывает необходимость изучения ответных реакций их обитателей и определение допустимых пределов этих воздействий (Папина, 2001).

Очень часто токсикантами являются тяжелые металлы (ТМ), такие как: ртуть, кадмий, свинец, стронций, никель, алюминий и другие. Загрязнение водоемов тяжелыми металлами – один из самых распространенных видов техногенного прессинга (Папина, 2001). Эта проблема особенно актуальна для рыб, поскольку они, во-первых, чаще всего не могут покинуть зону загрязнения из-за ограничений, определяемых размерами водоема, и, во-вторых, подвергаются воздействию тяжелых металлов не только через пищеварительную и дыхательную системы, но и через кожные покровы.

Патологические изменения, возникающие на уровне макромолекул и клеточных структур в результате взаимодействия с тяжелыми металлами, могут передаваться по цепочке до самых «высоких» уровней организации живого: популяций и целых биогеоценозов, поэтому возникает потребность в понимании биохимических механизмов защиты против повреждающих агентов на разных ступенях метаболизма (Лав, 1976).

В этом аспекте изучение участия низкомолекулярных соединений пептидной природы в процессах детоксикации ТМ очень перспектив-

но, так как для них установлен полифункциональный статус (Жуков, 1989).

Материалы и методы исследования

Методом жидкостной хроматографии низкого давления на носителе Toyopearl 40S были проведены исследования качественных и количественных вариаций фракционного состава низкомолекулярных пептидов (с молекулярной массой менее 10 кДа) мускулатуры плотвы *Rutilus rutilus L.* и щуки *Esox lucius L.*, выловленных в озере Каскесозеро и хвостохранилище Костомукшского ГОКа.

Озеро Каскесозеро – небольшое, достаточно глубоководное (до 35 м) олиготрофное озеро с площадью около 6 км². рН поверхностных вод этого водоема по нашим измерениям составляет 5,5–6,5. Активная хозяйственная деятельность на побережье отсутствует. Кроме плотвы и щуки в этом озере обитают окунь и налим, интродуцированы и успешно прижились сиг и рипус (*Coregonus albula L.*). Озеро Каскесозеро в наших исследованиях условно принято за «контрольный» водоем.

Функционирование горнорудного производства в г. Костомукше связано с воздействием на окружающую среду и прежде всего на водные экосистемы. Источником загрязнения в районе промузла являются, главным образом, техногенные воды системы оборотного водоснабжения. Для захоронения «хвостов» и оборотного водоснабжения комбината на базе близлежащего озера было создано хвостохранилище, которое более чем за 15 лет эксплуатации комбината превратилось в водохранилище объемом 430 млн м³ и площадью 34 км² (Пальшин и др., 1994). Главной особенностью ионного состава

вод хвостохранилища следует считать аномально высокое содержание калия (113,4–233,6 мг/мл – превышение фоновой концентрации в 40 раз), которое мало менялось с течением времени. Кроме калия в воде хвостохранилища превышены предельно допустимые концентрации (ПДК) для рыбохозяйственных водоемов по сульфатам, литию и марганцу. Необычной является величина отношения эквивалентных концентраций К:Na, равная 5,62 в 1998 г., а также преобладание группы щелочных металлов над щелочноземельными (2,3:1) (Состояние водных объектов Республики Карелия, 2007), что приво-

дит к заметному защелачиванию воды (по нашим измерениям рН поверхностных вод колеблется в пределах 8–8,5). В настоящее время ихтиофауна представлена в основном плотвой (*Rutilus rutilus L.*), щукой (*Esox lucius L.*) и сигом (*Coregonus lavaretus L.*).

Результаты исследования

В составе низкомолекулярных пептидов, экстрагированных из мышц плотвы, выявлено 5 основных фракций, которые можно разделить на 10 подфракций (рис. 1).

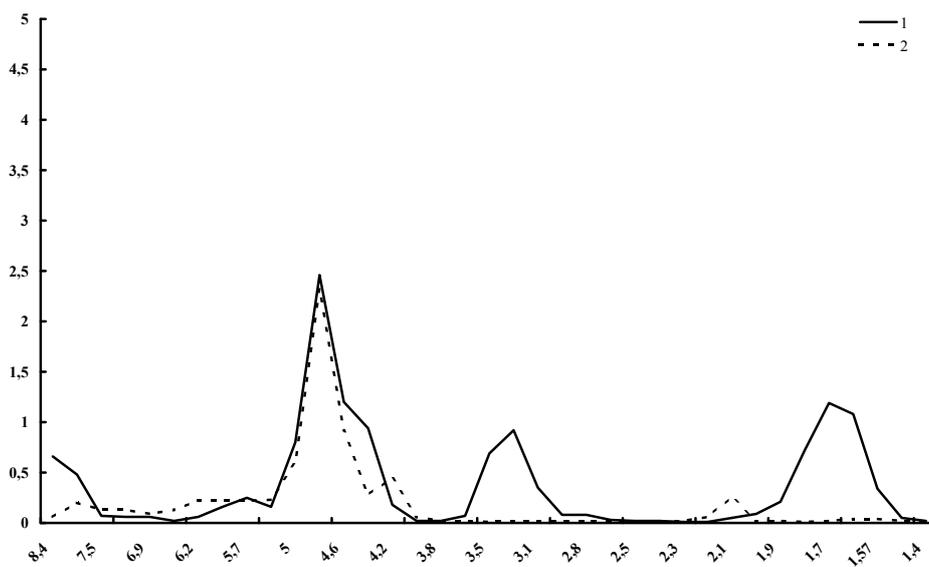


Рис. 1. Хроматограмма низкомолекулярных пептидов мышц плотвы

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 210 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

В таблице 1 приведены результаты количественного анализа состава низкомолекулярных пептидов. Показаны существенные различия между рыбами, отловленными в Каскесозере и в так называемом «хвостохранилище» Костомукшского ГОКа. В мышцах плотвы из контрольного водоема в большинстве фракций

уровень пептидов был выше, чем у рыб из загрязненного. Во фракциях с Мм $3,3 \pm 0,2$ и $1,7 \pm 0,1$ кДа уровень различий был очень высоким (20–100 раз). А во фракциях с Мм 4,2 и 2,1 кДа концентрация пептидов у особей из хвостохранилища была в 5–7 раз выше, чем у таковых из Каскесозера.

Таблица 1. Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях пептидов мускулатуры плотвы, выловленной из Каскесозера (1) и хвостохранилища Костомукшского ГОКа (2)*

Водоем	Номера фракций											
	1	2				3			4	5		
	Молекулярные массы, кДа											
	5	$4,5 \pm 0,3$				$3,3 \pm 0,2$			2,1	$1,7 \pm 0,1$		
	4,8	4,6	4,4	4,2	3,5	3,3	3,1		1,8	1,7	1,6	
1	63,1	198,0	95,7	79,4	6,3	55,0	77,6	20,0	1,9	56,2	89,3	100,0
2	47,7	219,0	77,6	14,6	31,6	1,1	1,1	1,1	13,2	1,1	1,1	1,1

* Ошибка среднего (m) для фракций с высоким содержанием пептидов не превышала $\pm 5-10\%$ среднего (M), для минорных фракций достигала $\pm 50\%$.

Анализ оптической плотности низкомолекулярных фракций, экстрагированных из мышц плотвы, на длине волны 250 нм, характерной для меркапидных связей, показал очень низкую оптическую активность пептидов на этой длине волны у рыб из хвостохранилища по сравнению с рыбами из контрольного водоема, что хорошо видно на рис. 2. Кратность различий между вариантами эксперимента по разным фракциям составляла 1,4 – 22 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о неблагоприятном воздействии на белковый метаболизм плотвы комплекса химических компонентов, входящих в состав техногенных вод, которые Костомукшский ГОК, накапливает в хвостохранилище.

На рисунке 3 представлены хроматограммы фракционного состава низкомолекулярных пептидов мускулатуры щук, выловленных из разных водоемов. Выявлено качественное сходство хроматограмм мышечной ткани щук их исследуемых водоемов практически по всем выделенным пептидным фракциям. Исключение составила фракция с Мм 3,7 кДа, которая у рыб из контрольного водоема визуально четко не выражена, но тем не менее количественно определялась (табл. 2).

Как показал сравнительный анализ концентрации НМ пептидов во фракциях, у щук из контрольного водоема концентрация пептидов в мышцах в низкомолекулярной части спектра была выше, чем у таковых из загрязненного водоема в 2,2–5,2 раза (фракции с Мм 4,4; 4,2; 2,2 и 2,1 кДа). В высокомолекулярной части спектра (фракции с Мм 4,8–5,7 кДа) у щук из Каскесозера выявлено в 1,1–3,6 раза меньше пептидов, чем у таковых из хвостохранилища. Наиболее сильные отличия выявлены во фракции с Мм 3,7 кДа (рис. 3). У рыб из загрязненного водоема концентрация пептидов в этой фракции была в 79 раз выше, чем у особей из чистого.

Наиболее сильные отличия выявлены во фракции с Мм 3,7 кДа (рис. 3). У рыб из загрязненного водоема концентрация пептидов в этой фракции была в 79 раз выше, чем у особей из чистого.

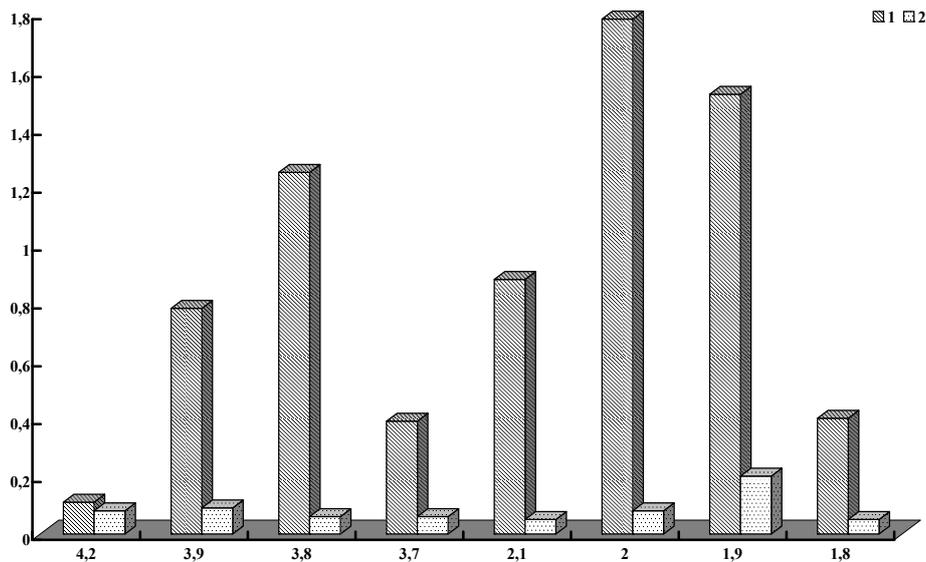


Рис. 2. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта низкомолекулярных пептидов из мышц плотвы

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОК; по оси ординат – оптическая плотность при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Таблица 2. Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях пептидов мускулатуры щуки, выловленной из Каскесозера (1) и хвостохранилища Костомукшского ГОКа (2)*

Водоем	Молекулярные массы, кДа									
	5,7	5,3	5	4,5±0,3				3,7	2,2	2,1
				4,8	4,6	4,4	4,2			
1	10,7	174,2	109,7	418,9	400,0	89,1	20,0	1,1	66,1	38,0
2	38,0	227,6	204,7	448,8	409,3	31,6	4,0	87,1	12,6	17,4

* Ошибка среднего (m) для фракций с высоким содержанием пептидов не превышала ±5–10% среднего (M), для минорных фракций достигала ±50%.

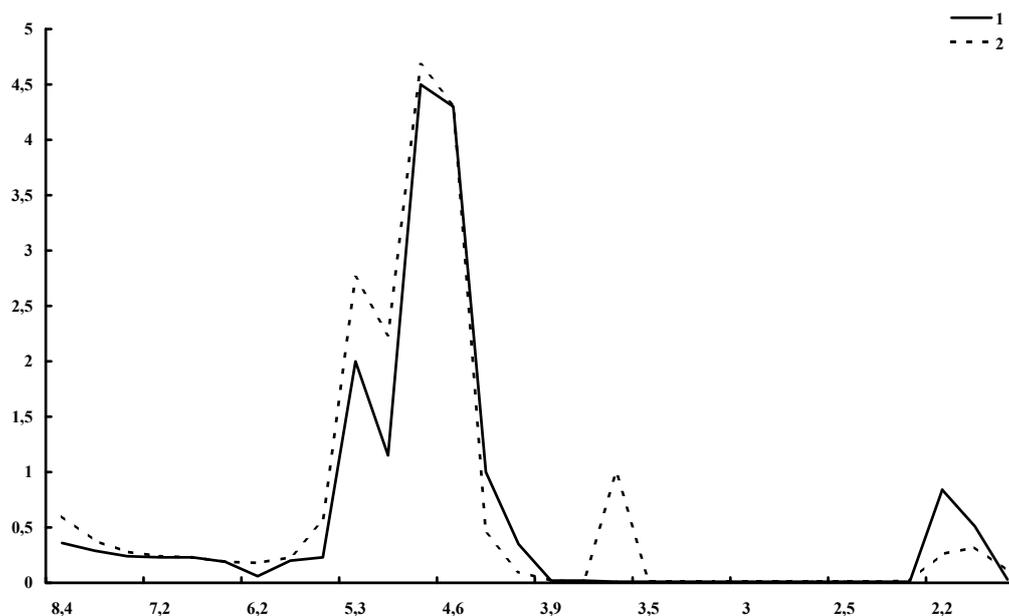


Рис. 3. Хроматограмма низкомолекулярных пептидов мышц щуки

1 – из оз. Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 207 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа

Количественный анализ компонентов пептидного пула мускулатуры щук при 250 нм показал, что в мышцах рыб из хвостохранилища, во всех фракциях уровень оптически активных на этой длине волны соединений был в 1,6–6 раз выше, чем у особей из Каскесозера (рис. 4). Эти данные, по нашему мнению, если принять вероятность

соответствия роста оптической активности при 250 нм и доли сульфгидрильных групп, об адекватной биохимической ответной реакции организма щук на уровне НМ пептидов мускулатуры на экологически неблагоприятный гидрохимический состав водной среды, сложившийся в хвостохранилище Костомукшского ГОКа.

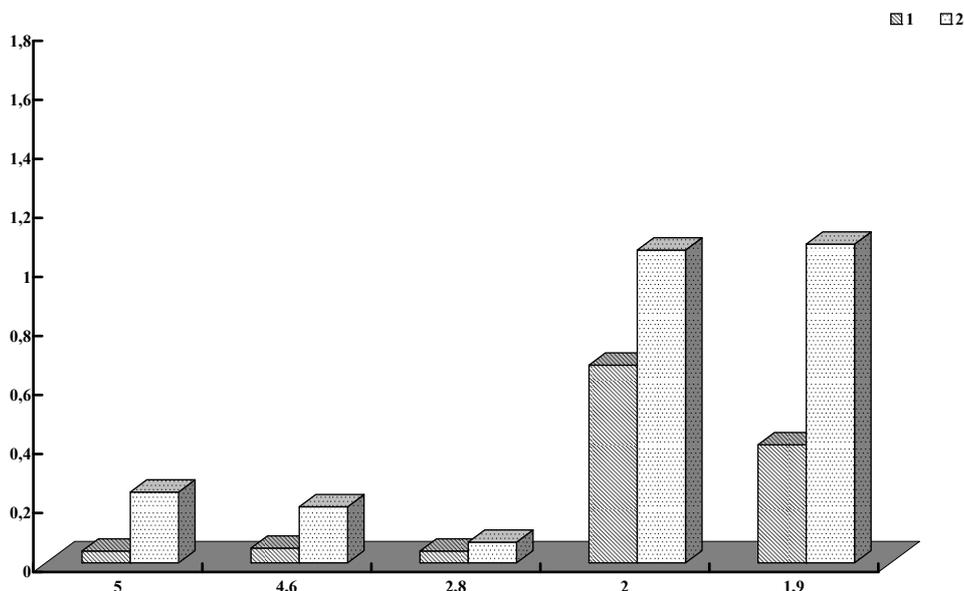


Рис. 4. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта низкомолекулярных пептидов из мышц щуки

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – оптическая плотность при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа.

Заключение

Выяснение биохимических механизмов развития адаптивных реакций у животных является важным аспектом решения одной из фундаментальных проблем биологии – взаимодействия организма и среды. Результаты таких исследований могут иметь несомненное значение для выяснения как специфических, так и общих механизмов развития адаптационного процесса.

Следует отметить разный характер ответной реакции плотвы и щуки, выловленной в хвостохранилище Костомукшского ГОКа, на тип загрязнения, существующий в данном водоеме. У плотвы из хвостохранилища практически во всех фракциях пептидов, выделенных из мускулатуры, происходило снижение как общей доли пептидов, определяемых по оптической плотности при 207 нм, так и компонентов, оптически активных при 250 нм, по сравнению с таковыми рыб из Каскесозера. У щуки из этого водоема снижение доли общих пептидов наблюдали только в четырех фракциях из десяти, а в остальных доля пептидов в мышечном экстракте была выше, чем у особей из Каскесозера. Оптическая активность при 250 нм у рыб из

хвостохранилища во всех выявленных фракциях была выше, чем у щуки из чистого водоема. Суть этого феномена не вполне понятна и, возможно, кроется в различной экологии этих видов.

Существует гипотеза (Карелин, 2003) о том, что пептидный пул организма является носителем информации о биохимическом статусе ткани. Поэтому расширение знаний о роли низкомолекулярных пептидов может иметь важное значение для оценки состояния организмов и решения проблем биоиндикации природных сред. Количественные соотношения компонентов пептидных спектров могут быть использованы в качестве одного из биохимических тестов при определении степени антропогенной нагрузки на живые организмы.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» НШ 3731.2010.4; программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2009–2011 гг.; программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» на 2009–2011 гг.

Литература

Жуков П. И. Справочник по экологии пресноводных рыб. Минск: Наука и техника. 1989. 310 с.

Карелин А. А. Тканеспецифические пептидные пулы как элемент информационной системы организма // Российский симпозиум по химии и биологии пептидов. М. 2003. С. 19.

Лав Р. М. Химическая биология рыб: Мир. 1976. 349 с.

Пальшин Н. И., Сало Ю. А., Кухарев В. И. Влияние Костомукшского ГОКа на экосистему р. Кенти. Гидрологические и гидрохимические аспекты // Ис-

следование и охрана водных ресурсов бассейна Белого моря (в границах Карелии). Петрозаводск. 1994. С. 140–161.

Папина Т. С. Транспорт и особенности распределения тяжелых металлов в речных системах. Новосибирск: Наука. 2001. Серия «Экология». Вып. 62. 58 с.

Пептиды // Под. ред. Ивановой В. Т. М.: 1983. 438 с.

Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998–2006 гг. // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2007. 210 с.

THE EFFECT OF INDUSTRIAL WATERS OF MINING FACTORY ON LOW MOLECULAR WEIGHT PEPTIDE'S COMPOSITION OF SOME SPECIES OF FISHES

I.V. Sukhovskaya, E.V. Borvinskaya, L.P. Smirnov

*Institute of biology, Karelian Research Centre of RAS, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: levps@rambler.ru*

By method of low pressure liquid chromatography on Toyopearl TSK HW-40S the qualitative and quantitative composition of low molecular weight peptides (10 kDa and lower) of pike and roach muscles from reservoirs with different ecological conditions (industrial water of

mining plant and clear lake) was investigated. Quantitative change in composition of components enriched with sulf-hydryl groups was revealed. Received data show that pike protein metabolism in condition of sharp shift of $\text{Na}^+:\text{K}^+$ balance to K^+ violate in essentially lower degree than in roach.

ВЛИЯНИЕ ДИМОКСИСТРОБИНА НА МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* И *ACIPENCER RUTHINUS L.*

Е. А. Фёдорова, Н. И. Щербакова

Азовский НИИ Рыбного Хозяйства (ФГУП «АзНИИРХ»), г. Ростов-на-Дону, Россия,
e-mail: elena_viva@mail.ru

Токсические элементы и вещества – самый опасный вид загрязнения окружающей среды с еще до конца не исследованными отдаленными последствиями для живых систем (Моисеенко, 2008). Пестициды, в этом отношении занимают особое место. Их опасность для водоемов обусловлена двумя обстоятельствами – высокой биологической активностью и сознательным, обусловленным технологией применения, рассеиванием их в окружающей среде. В последние годы отмечена тенденция увеличения использования высокоактивных пестицидов с низкими нормами расхода (Ильинская и др., 2001). К числу таких пестицидов относят стробилуриновые фунгициды, которые стали использоваться в мировой сельскохозяйственной практике с 1999 года (Рубчиц, 2005). Они представляют собой препараты с широким спектром защитного и лечебно-профилактического действия для сельскохозяйственных культур. Однако степень токсического воздействия этих

фунгицидов на водные биоценозы не установлена, так же не исследованы механизмы действия стробилуринов для гидробионтов.

Целью исследования являлось изучения влияния стробилуринового фунгицида – *Димоксистробина* на выживаемость и морфометрические показатели планктонных ракообразных – *Daphnia magna Straus* и предличинок осетровых рыб – *Acipenser ruthenus L.*

Морфометрические показатели (линейный рост и вес) дафний исследовались в течение 10 суток, у предличинок бестера в течение 7 суток. Диапазон концентраций для дафний 0,0001–0,05 мг/л., для предличинок бестера 0,0001–0,001 мг/л.

Первым этапом исследований проводилась оценка выживаемости гидробионтов в токсических средах *Димоксистробина*. На основе выживаемости тест-объектов в острых опытах рассчитаны токсикометрические параметры, представленные в таблице 1

Таблица 1. Основные токсикометрические параметры *Димоксистробина* для гидробионтов в острых опытах (мг/л)

Гидробионт	Экспозиция опыта	Димоксистробин
Дафнии (<i>Daphnia magna Straus</i>)	96 ч	ЛК ₀ = 0,0005 ЛК ₁₆ = 0,002 ЛК ₅₀ = 0,042
Предличинки бестера (<i>Acipenser ruthenus L.</i>)	48 ч	ЛК ₀ = 0,005 ЛК ₁₆ = 0,008 ЛК ₅₀ = 0,020

Расчет среднелетальных концентраций позволил определить, что *Димоксистробин* относится к группе особо токсичных пестицидов для дафний и предличинок бестера (ЛК₅₀ < 0,5 мг/л). Большой чувствительностью к действию *Димоксистробина* отличались планктонные ракообразные.

Клиническая картина первичного отравления предличинок бестера при действии стробилури-

на характеризовалась признаками нервно-паралитического характера. С первых часов интоксикации у предличинок бестера нарушалась двигательная активность, они залегали на дно экспериментальных сосудов, совершая судорожные движения. Длительные спазмы приводили со временем к искривлению туловища рыб. С увеличением концентраций и длительности воз-

действия у предличинок развивалась полная потеря двигательной активности, снижение реакции на механическое раздражение (укол иглой). Указанные симптомы отравления в 6-ти суточном эксперименте сопровождалось развитием водянки желточного мешка и кровоизлияниями в области сердца. Вышеописанные признаки интоксикации отмечались в концентрациях *Димоксиробина* от 0,01 и более в остром эксперименте.

Поведение дафний в концентрации, на вызывающей гибели рачков, ни чем не отличалось от поведения таковых в контроле. Уже в следующей концентрации 0,005 мг/л движения дафний были резки и беспорядочные. В максимальной концентрации 1,0 мг/л дафнии опускались на дно сосуда и погибали к концу эксперимента.

Вторым этапом работы было исследование воздействие *Димоксиробина* на темп роста и массу тела гидробионтов. Были определены пороговые и недействующие концентрации токсикантов для каждого из тест-объектов:

Рост рачков зависит от характера пластического обмена, который складывается из прироста массы тела (соматический рост), периодически сбрасываемого вещества экспериментов (экзувиальный рост) и продуцирования половых продуктов (генеративный рост) (Хмелева, 1988). Линейные размеры тела рачков достоверно начали снижаться, начиная с концентрации 0,001 мг/л в 1,3 раза. В следующих концентрациях 0,005 мг/л, 0,01 мг/л и 0,05 мг/л отмечено дозозависимое снижение темпов роста рачков против контроля в 1,4–1,5 раза. (Рис. 1). Масса кладоцер в растворах *Димоксиробина* была на уровне контроля в концентрациях 0,0001 мг/л и 0,0005 мг/л. В более высоких концентрациях отмечалось все более возрастающее отставания от нормы: в концентрациях 0,001–0,05 мг/л на 53–61%. (Рис. 2).

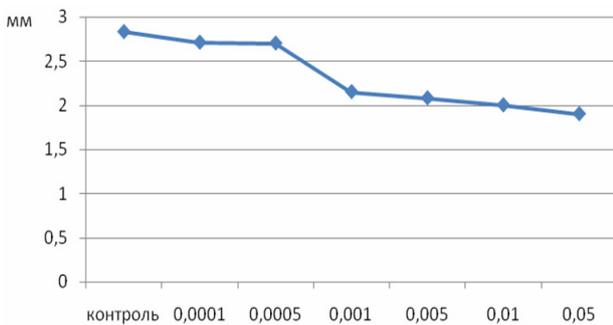


Рис. 1. Линейные размеры *Daphnia magna* при экспозиции в растворах *Димоксиробина* различной концентрации

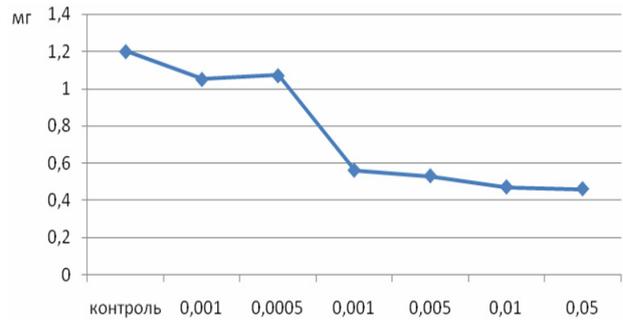


Рис. 2. Масса *Daphnia magna* при экспозиции в растворах *Димоксиробина* различной концентрации

Анализ морфометрических показателей подопытных предличинок бестера показал, что *Димоксиробин* в концентрациях 0,0005 и 0,001 мг/л, вызывал снижение темпа весового роста, при этом линейный рост достоверно не изменялся. В концентрации 0,0001 мг/л по всем изученным показателям у предличинок бестера отклонения от нормы не отмечалось. (Рис. 3, 4).

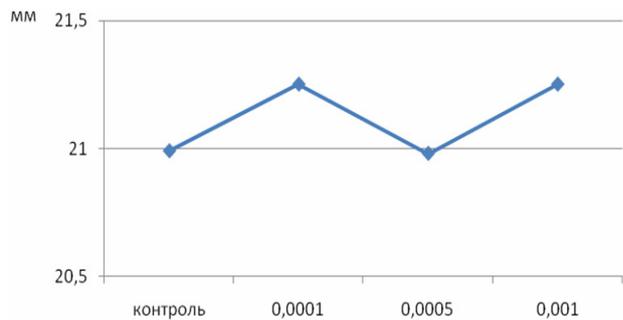


Рис. 3. Линейные размеры *Acipenser ruthenus L* при экспозиции в растворах *Димоксиробина* различной концентрации

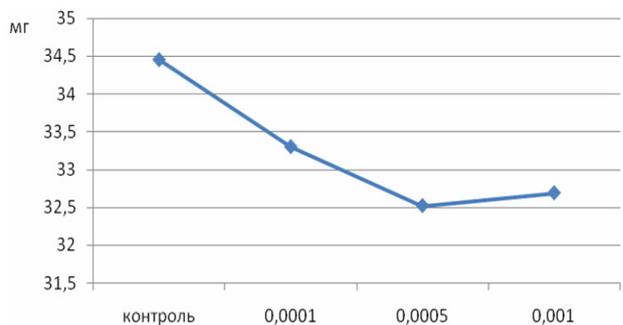


Рис. 4. Масса *Acipenser ruthenus L* при экспозиции в растворах *Димоксиробина* различной концентрации

В результате статистической обработки данных установлены недействующие (NOEC) и по-

роговые (ЛОЕС) концентрации *Димоксистробина* для ветвистоусых ракообразных и предли-

чинки бестера по изученным показателям (таблица 2).

Таблица 2. Недействующие (NOЕС) и пороговые (ЛОЕС) концентрации *Димоксистробина* для дафний и предличинок бестера (мг/л)

Параметры исследования	Дафнии		Предличинки бестера	
	NOЕС	ЛОЕС	NOЕС	ЛОЕС
Линейный рост, мм	0,0005	0,001	0,001	>0,001
Масса, мг	0,0005	0,001	0,0001	0,0005

В результате проведенных исследований установлено, что *Димоксистробин* оказался высокотоксичным для *Daphnia magna Straus* и *Acipenser ruthenus L.* Порог чувствительности дафний к *Димоксистробину* составил величину 0,0005 мг/л – начиная с этой концентрации, происходило подавление линейного и весового рос-

та рачков. Для предличинок осетровых пороговой концентрацией являлась 0,0001 мг/л., в которой происходило угнетение весового роста.

Таким образом, фунгицид *Димоксистробин* в низких концентрациях вызывал нарушения пластического обмена приводящий к снижению темпов линейного и роста и веса гидробионтов.

Литература

Ильницкая А. В., Липкина Л. В., Березняк И. В., Федорова С. Г. // Материалы IX Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей. – М., 2001. Т. 2. – С. 91–94.

Моисеенко Т. И. Водная токсикология в теории и в практике // Материалы III Всероссийской Конференции по водной токсикологии «Антропогенное

влияние на водные организмы и экосистемы», Борок 11–16 ноября 2008 г., Ярославль: ООО «Ярославский двор», 2008. С. 127–135.

Рубчиц О. В. Компания БАСФ, политика успеха // Сельскохозяйственные вести – 2005. № 4 – htm.

Хмелева Закономерности размножения ракообразных. – Минск: наука и техника, 1988. – С. 204.

AQUATIC TOXICITY OF DIMOXISTROBIN TO *DAPHNIA MAGNA* STRAUS AND *ACIPENCER RUTHENUS* L.

E.A. Fedorova, N.I. Shcherbakova

Azov Fisheries Research Institute, (FGUP AzNIIRKH), Rostov-on-Don, Russia,
e-mail: elena_viva@mail.ru

We have studied the effect of the stobilurin fungicide Dimoxistrobina on survival and morphometric parameters of the crustaceans (*Daphnia magna* Straus) and sturgeon prelarvae (*Acipenser ruthenus* L). The threshold of daphnia sensitivity to Dimoxistrobina is shown to be 0,0005 mg/l. Beginning from this concentration we

observed a dose-dependant decrease in the size and weight of crustaceans. The threshold concentration for sturgeon prelarvae amounted to 0,0001 mg/l, with their weight slowing down but no effects on their size. Low concentrations of Dimoxistrobina are found to affect metabolism, which causes a decrease in the weight and size of hydrobionts.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ГЕПАТОПАНКРЕАСА *ASTERIAS RUBENS* L. КАНДАЛАКШСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ

Н. Н. Фокина¹, Н. В. Лесонен², Т. Р. Руоколайнен¹, З. А. Нефедова¹, О. В. Фомина²,
Г. А. Шкляревич², Н. Н. Немова¹

¹ Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: fokinann@gmail.com

² ГОУ ВПО Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия

Введение

Исследования беспозвоночных в Кандалакшском заливе Белого моря вызывают значительный интерес. Морские организмы на различных уровнях организации подвергаются комплексному воздействию факторов окружающей среды. Акватория Кандалакшского залива подвержена влиянию ряда антропогенных факторов (тяжелые металлы, нефтяное загрязнение, бытовые стоки, промышленные отходы), более того, отдельные участки залива значительно отличаются между собой гидрологическими условиями, а также температурно-солевым режимом (Шкляревич, 1999).

Asterias rubens L. является типичным стеногалинным бентосным животным, который не переносит значительного опреснения морской воды. Необходимо отметить, что морская звезда играет важную роль в трофической сети Белого моря, являясь с одной стороны, хищником для двусторчатого моллюска *Mytilus edulis* L. а, с другой – одним из компонентов питания гаги обыкновенной *Somateria mollissima* L. (Фомина, 2010).

Известно, что первичный ответ организма на влияние загрязняющих веществ наблюдается на молекулярном, биохимическом и клеточном уровнях, то есть наступает до появления физиологических и морфологических нарушений (Bertoli et al., 2001). Более того, изменения биохимических показателей отражают состояние обмена веществ и зачастую свидетельствуют о развитии компенсаторного ответа организма на воздействие неблагоприятных факторов, в том числе и загрязняющих веществ (Немова, Высоцкая, 2004). При этом в ответ на стрессовое воз-

действие внешних факторов, в организме изменяется метаболизм липидов, что может отразиться на его липидном составе (Крепс, 1981).

В настоящей работе исследован липидный состав тканей гепатопанкреаса *Asterias rubens* L., обитающих на литорали и верхнем горизонте сублиторали некоторых биотопов Кандалакшского залива Белого моря, различных по гидрологическим условиям, температурно-солевому режиму и антропогенной нагрузке.

Материал и методы

Сбор морских звезд *Asterias rubens* L. осуществлялся на участках литорали и верхней сублиторали различных биотопов охраняемой территории ФГУ «ГПЗ «Кандалакшский» во время отлива. Максимальный диаметр исследуемых животных составлял от 67,0 до 199,4 мм, а радиус – от 32,0 до 99,1 мм. Экстракцию липидов из гепатопанкреаса *Asterias rubens* L. проводили смесью хлороформ/метанол (2:1, по объему) по методу Фолча (Folch et al., 1957). Состав общих липидов, отдельных фракций фосфолипидов и жирнокислотный спектр суммарных липидов анализировали методами тонкослойной, высокоэффективной жидкостной и газожидкостной хроматографией (Сидоров и др., 1972; Engelbrecht et al., 1974; Цыганов, 1971; Arduini et al., 1996). Достоверность различий состава общих липидов и отдельных жирных кислот в гепатопанкреасе морских звезд, обитающих в разных биотопах Кандалакшского залива Белого моря, оценивали многофакторным дисперсионным анализом.

Химический анализ морской воды из разных участков акватории Кандалакшского залива Бе-

лого моря проводила Федеральная служба по экологическому, технологическому и атомному надзору, филиал федерального государственного учреждения «Центр лабораторного анализа и технических измерений по северо-западному федеральному округу» – «Центр лабораторного анализа и технических измерений по Республике Карелия»

Результаты и обсуждение

Проведено исследование состава общих липидов, отдельных фракций фосфолипидов и спектра жирных кислот суммарных липидов в тканях гепатопанкреаса морских звезд *Asterias rubens* L., обитающих в различных биотопах Кандалакшского залива Белого моря (рис. 1). Исследуемые места обитания звезд отличаются между собой не только физико-географическими характеристиками (Шкляревич, 1999), но и содержанием в морской воде различных загрязняющих веществ (в частности, нефтепродуктов и тяжелых металлов) (табл. 1).

Кластерный анализ стандартизированных данных о температурно-солевом режиме исследуемых биотопов Кандалакшского залива Белого моря, а также данных о содержании загрязняющих веществ в морской воде позволил выделить несколько групп (рис. 2).



Рис. 1. Карто-схема района исследования

Таблица 1. Содержание некоторых тяжелых металлов и нефтепродуктов в морской воде (мг/дм³), взятой в исследуемых биотопах Кандалакшского залива Белого моря

Название биотопа	Нефтепродукты	Железо	Медь	Цинк	Марганец	Свинец
Турый мыс	3,00	0,02	0,08	0,00	0,00	0,00
Порья губа	0,56	0,02	0,07	0,00	0,00	0,00
О. Ряшков	0,38	0,02	0,07	0,02	0,00	0,00
Воронья губа	0,14	0,02	0,06	0,03	0,00	0,00
О. Олений	0,06	0,02	0,04	0,01	0,00	0,00
ПДК для морских вод	0,05	0,05	0,01	0,05	0,05	0,01

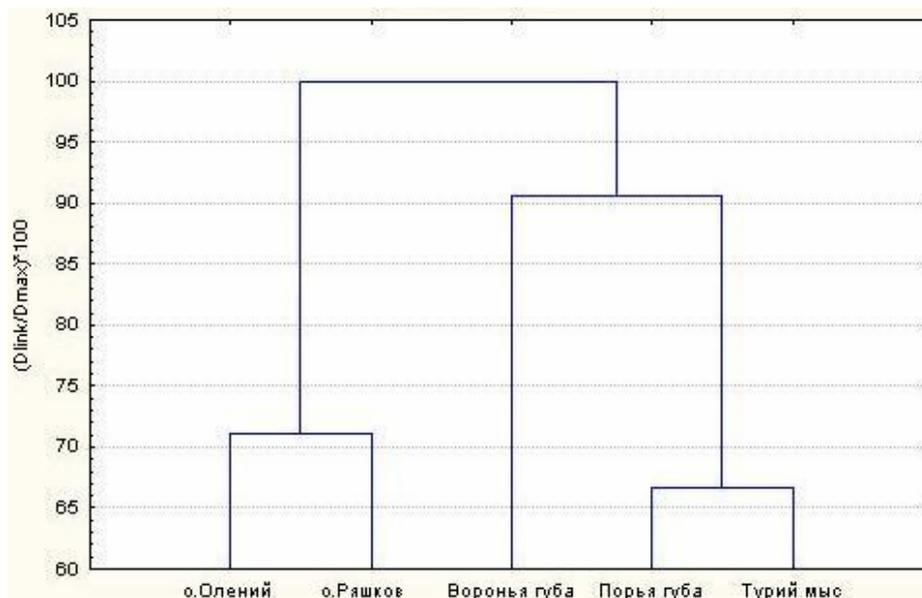


Рис. 2. Дендрограмма различий между исследуемыми местами обитания *Asterias rubens* L. в Кандалакшском заливе Белого моря

В настоящей работе оценивали содержание запасных (в частности, триацилглицеринов и эфиров холестерина) и структурных (а именно, фосфолипидов и холестерина) липидных компонентов, а также жирных кислот суммарных липидов (% от суммы жирных кислот) и отдельных фракций фосфолипидов (% сухой массы) в тканях гепатопанкреаса беломорских *Asterias*

rubens L., в зависимости от условий среды их обитания (рис. 4, рис. 5, табл. 2). Интересно отметить, что статистический анализ стандартизированных данных о содержании общих липидов (структурных и запасных компонентов) морских звезд из исследуемых мест обитаний в Кандалакшском заливе Белого моря позволил объединить их в схожие кластеры (рис. 3).

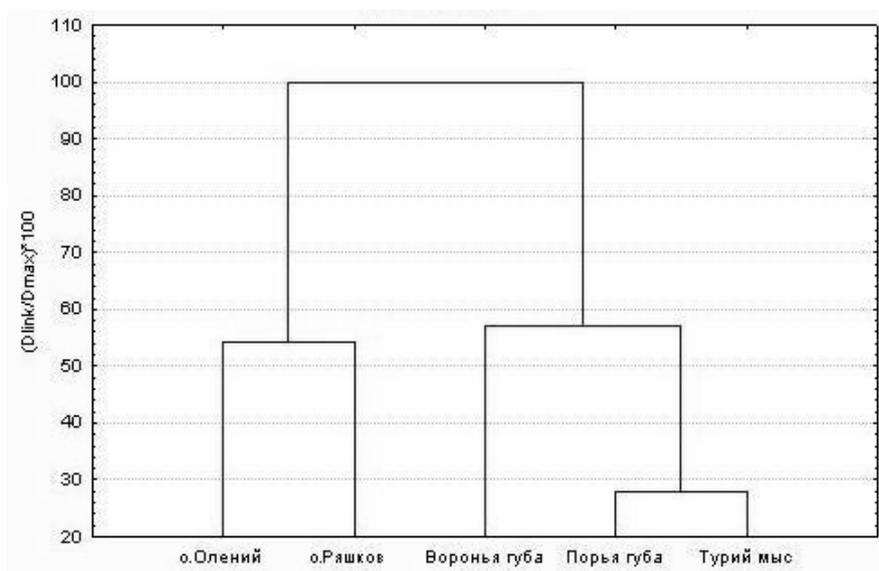


Рис. 3. Дендрограмма различий в составе общих липидов *Asterias rubens* L., обитающих в исследуемых биотопах в Кандалакшском заливе Белого моря

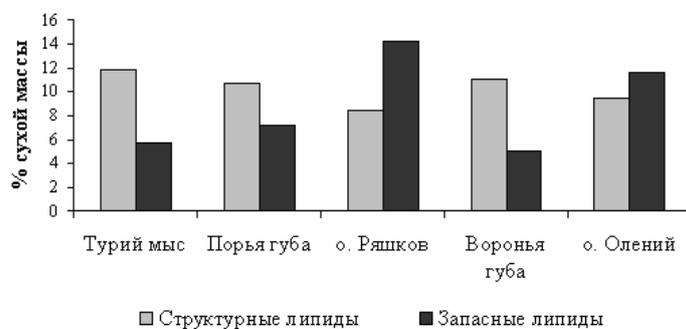


Рис. 4. Содержание структурных и запасных липидных компонентов (% сухой массы) в тканях гепатопанкреаса *Asterias rubens* L., обитающих в различных биотопах Кандалакшского залива Белого моря

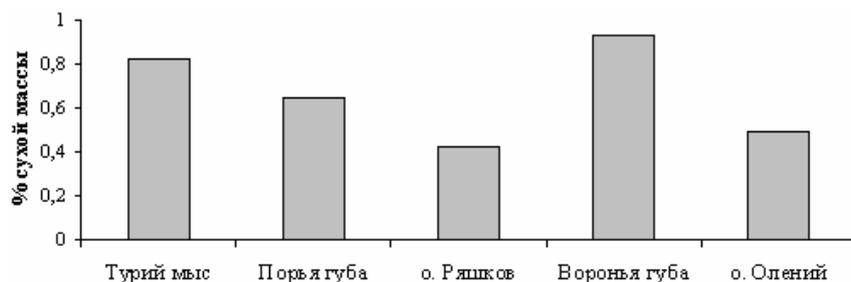


Рис. 5. Содержание фосфатидилинозитола (% сухой массы) в тканях гепатопанкреаса *Asterias rubens* L., обитающих в различных биотопах Кандалакшского залива Белого моря

Таблица 2. Жирнокислотный спектр общих липидов (% от суммы жирных кислот) в тканях гепатопанкреаса *Asterias rubens* L., обитающих в различных биотопах Кандалакшского залива Белого моря

Название биотопа	∑ НЖК	∑ МНЖК	∑ n-3 ПНЖК	∑ n-6 ПНЖК	∑ n-9 ПНЖК	∑ НМРЖК	∑ ПНЖК
Турый мыс	22,72	33,59	20,17	14,88	4,63	2,60	39,68
Порья губа	24,29	31,37	22,65	13,51	4,64	2,00	40,80
О. Ряшков	25,33	42,34	18,14	8,51	2,86	1,13	29,51
Воронья губа	17,30	33,08	27,78	14,35	3,69	1,52	45,82
О. Олений	22,15	38,63	21,69	11,73	3,36	1,27	36,78

Примечание к таблице 2: НЖК – насыщенные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; НМРЖК – метилэтерифицированные жирные кислоты.

Липидный состав морских звезд, обитающих в биотопах **островов Ряшков и Олений**, достоверно отличается от такового у *Asterias rubens* L. из других исследуемых местообитаний в Кандалакшском заливе Белого моря, главным образом за счет запасных липидных компонентов (триацилглицеринов и эфиров холестерина) (рис. 4). Более того, жирнокислотный состав общих липидов морских звезд из данных островных биотопов характеризуется повышенными концентрациями насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (табл. 2), которые, как известно, являются основными компонентами триацилглицеринов (Brockhoff et al., 1968; Brockhoff, 1971; Крепс, 1981). Отмеченные особенности липидного состава *Asterias rubens* L. указывают на относительно благоприятные условия обитания звезд в данных биотопах. Острова Северного архипелага (в частности, о. Ряшков) характеризуются стабильными гидрологическими условиями с низкой волновой активностью, слабыми течениями и правильными посуточными приливами и отливами (Шкляревич, 1999). Кроме того, для литоральной зоны и участков верхней sublиторали островов Ряшков и Олений характерно обилие основного кормового объекта морской звезды – мидии обыкновенной *Mytilus edulis* L. (Шкляревич, Фомина, 2008). Следовательно, высокие концентрации запасных липидов у *Asterias rubens*, обитающих в данных биотопах, могут свидетельствовать о благоприятных для них кормовых условиях этих мест обитаний. В тоже время, акватория острова Олений подвержена частым воздействиям пресной воды (вблизи острова располагается гидротехническое сооружение). Состав общих липидов и жирных кислот *Asterias rubens* L., обитающих на литорали о. Олений, отличается повышенным содержанием структурных липидов (главным образом, фосфолипидов) и n-6 полиеновых кислот. Показано, что концентрация жирных кислот n-6 ряда, в частности арахидо-

новой кислоты, повышается при воздействии на водные организмы неблагоприятных факторов среды обитания (Тойвонен и др., 2001), в том числе и пониженной солености (Фокина и др., 2010). Липидный состав *Asterias rubens*, обитающих также в относительно спокойных гидрологических условиях в акватории **Вороньей губы**, отличается пониженными значениями запасных липидов и сравнительно высоким содержанием структурных липидных компонентов и полиеновых жирных кислот n-3 семейства. Схожий количественный состав общих липидов наблюдается у морских звезд, обитающих на литорали и верхней sublиторали Порьей губы и Турьего мыса. Биотопы **Порьей губы и Турьего мыса** являются зонами большой прибойности с сильными ветро-волновыми явлениями, в результате которых бентосное сообщество морских организмов, обитающих на литорали и верхней sublиторали, претерпевает более резкие колебания гидрологических условий по сравнению с другими районами Кандалакшского залива Белого моря (Шкляревич, 1999). Кроме того, химический анализ морской воды из районов Порьей губы и Турьего мыса показал повышенное содержание в ней нефтепродуктов и ионов меди (табл. 1). Липидный состав *Asterias rubens* L., обитающих в данных биотопах, отличается повышенными концентрациями структурных липидов, а также полиненасыщенных жирных кислот n-6 и n-9 рядов и жирных кислот с необычной структурой – метилэтерифицированных (НМР) кислот. Отмеченные особенности липидного состава морских звезд, обитающих на литорали и в верхней sublиторали Порьей губы и Турьего мыса, отражают воздействие широкого спектра неблагоприятных факторов, характерных для этих мест обитаний. Известно, что НМР жирные кислоты, благодаря особенностям своей химической структуры, обеспечивают стабильность клеточных мембран при различных неблагоприятных воздействиях (Жукова, 1992). В тоже вре-

мя высокий уровень n-6 и n-9 ПНЖК в тканях гепатопанкреаса звезд также свидетельствует о стрессовых условиях обитания *Asterias rubens* (Тойвонен и др., 2001; Saito, 2008; Фокина и др., 2010). Обращает на себя внимание, повышенное содержание фосфатидилинозитола (ФИ) у морских звезд, обитающих на относительно нестабильных участках литорали и верхней сублиторали Вороньей губы, Турьего мыса и Порьей Губы. Эти данные согласуются с повышенными концентрациями n-6 полиеновых кислот у *Asterias rubens* из исследуемых биотопов. Известно, что ФИ – это минорный компонент клеточных мембран, который играет важную роль в обмене веществ. Кроме того, он служит источником n-6 ПНЖК, а именно арахидоновой кислоты, которая является метаболическим предшественником для синтеза эйкозаноидов, активно участвующих в адаптивных процессах орга-

низма к изменяющимся условиям среды обитания (Bell et al., 1986; Ткачук, 1998).

Таким образом, *Asterias rubens* L., обитающие в разных биотопах Кандалакшского залива Белого моря, отличаются содержанием общих липидов, отдельных фракций фосфолипидов и жирных кислот суммарных липидов, что свидетельствуют о возможных эволюционных адаптивных механизмах на уровне липидного состава к столь широкому спектру факторов окружающей среды, характерному для исследуемых мест обитаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (08-04-01140а); Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731-2010.4); Программы фундаментальных исследований Президиума РАН на 2009–2011 гг. «Биологическое разнообразие».

Литература

Жукова Н. В. Неметиленразделенные жирные кислоты морских двустворчатых моллюсков: распределение по тканям и классам липидов // Ж. эволюц. биохим. и физиол. 1992. Т. 28. № 4. С. 434–440.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов. Л. 1981. 339 с.

Немова Н. Н., Высоцкая Р. У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука. 2004. 215 с.

Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. // Липиды рыб. 1. Методы анализа. Петрозаводск: КФАН СССР, 1972. С. 150–162.

Ткачук В. А. Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} (обзор) // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 1. С. 47–56.

Тойвонен Л. В., Нефедова З. А., Сидоров В. С., Шарова Ю. Н. Адаптационные изменения в спектрах жирных кислот тканевых липидов сига *Coregonus lavaretus* L. при влиянии антропогенных нагрузок // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 3. С. 364–368.

Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mytilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2010. 243 с.

Фомина О. В. Биология морской звезды *Asterias rubens* L. в экосистемах Белого моря // Автореф. дисс... канд. биол. наук. Петрозаводск. 2010. 24 с.

Цыганов Э. П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагелем // Лабор. дело. 1971. № 8. С. 490–493.

Шкляревич Г. А. Водоросли и беспозвоночные животные мелководий Порьей губы // РАН КНЦ. Апатиты. 1999. 70 с.

Шкляревич Г. А., Фомина О. В. Характеристика некоторых особенностей биологии морской звезды *Asterias rubens* L. на мелководьях Кандалакшского залива Белого моря // Труды Петрозаводского государственного университета. Серия Биология. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ. 2008. Вып. 2.: Вопросы популяционной экологии. С. 248–256.

Arduini A., Pescechera A., Dottori S., Sciarioni A.F., Serafini F., Calvani M. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // Journal of Lipid Research. 1996. VOL. 37. PP. 684–689.

Bell M.V., Henderson R.J., Sargent J.R. The role of polyunsaturated fatty acids in fish // Comp Biochem Physiol B. 1986. 83(4), PP. 711–719

Bertoli E., Ambrosini A., Zolese G., Gabbianelli R., Fedeli D., Falcioni G. Biomembrane perturbation induced by xenobiotics in model and living system // Cell Biol Mol Lett. 2001. VOL. 6. issue 2A. PP. 334–339.

Brockerhoff H. Stereospecific analysis of triglycerides. // Lipids. 1971. 6. PP. 942–956.

Brockerhoff H., Hoyle R.J., Hwang P.C., Litchfield C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. // Lipids. 1968. 3. PP. 24–29.

Engelbrecht F.M., Mari F., Anderson J.T. // S.A. Med. J. 1974. V 48. № 7. PP. 250–256.

Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. PP. 497–509.

Saito H. Unusual novel n-4 polyunsaturated fatty acids in cold-seep mussels (*Bathymodiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons*), originating from symbiotic methanotrophic bacteria. // J Chromatogr A. 2008. vol. 1200(2). PP. 242–54.

**LIPID COMPOSITION OF HEPATOPANCREAS *ASTERIAS RUBENS* L.
FROM KANDALAKSHA BAY OF THE WHITE SEA**

**N.N. Fokina¹, N.V. Lesonen², T.R. Ruokolainen¹, Z.A. Nefedova¹,
O.V. Fomina², G.A. Shklyarevich², N.N. Nemova¹**

¹ *Institute of Biology, Karelian Research Centre of RAS, Petrozavodsk, Russia*

² *Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia,*

e-mail: fokinann@gmail.com

The lipid, phospholipids and fatty acid composition of starfish *Asterias rubens* L. from different habitats of Kandalaksha Bay of the White Sea were analyzed. These habitats of starfishes differ on hydrological conditions, temperature and salt regime and anthropogenic pressure. High concentrations of reserve lipids (such as triacylglycerols and cholesterol esters) in *Asterias rubens*, living in relatively comfortable sites of Islands Ryashkov and Olenii, indicate favorable conditions for them. Reported features of the lipid composition

of starfish inhabiting in the intertidal and upper subtidal zones of Porey inlet and Turii Cape, reflect the impact of a wide range of adverse factors typical for these habitats. Thus, *Asterias rubens* L., living in different regions of the Kandalaksha Bay of the White Sea, differ in lipid, phospholipids and fatty acids contents, indicating a possible evolutionary adaptive mechanisms at the lipid composition level to a wide range of environmental factors (vary hydrological conditions, temperature and salt regime, and anthropogenic pressure etc).

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ФОРМИРОВАНИЮ РЕФЕРЕНТНЫХ ГРУПП БЕНТОСНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ОЦЕНОК ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

С. В. Холодкевич, Т. В. Кузнецова, С. В. Сладкова, Г. П. Удалова, В. А. Любимцев

Учреждение Российской Академии наук Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Центр экологической безопасности РАН, г. Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: kholodkevich@mail.ru

Введение

При проведении биомониторинговых или экотоксикологических исследований часто приходится сталкиваться с тем, что даже в группе однородных по размерно-весовым показателям животных, взятых из одной природной микропопуляции, могут наблюдаться значительные количественные различия их реакций на одни и те же воздействия. Обычно для токсикологических исследований применяют стандартные методы отбора животных одного вида, одной генетической линии, одного возраста и пола, сходных по морфометрическим характеристикам и без видимых повреждений. Однако, как показали наши исследования, такой подход является необходимым, но не достаточным. В результате многочисленных экспериментов на бентосных беспозвоночных: речных раках (*Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus*) и моллюсках (*Mytilus edulis* L., *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Littorina littorea* L. и др.) нами установлено, что индивидуальные различия в ответах тест-животных, отобранных по указанным общепринятым показателям, могут достигать 40–50% по характеристикам кардиоактивности (ЧСС) и общему белку гемолимфы (Кузнецова и др., 2010).

Исходя из вышесказанного, весьма существенным представляется поиск методических подходов для выявления таких физиологических, биохимических или поведенческих показателей, которые наиболее полно отражали бы индивидуальные особенности животного, в частности состояние организма в целом, или функциональное состояние тестируемой системы, в частности сердечно-сосудистой.

Настоящая работа была посвящена поиску именно таких подходов с целью определения

критериев отбора бентосных беспозвоночных и формирования референтных групп тест-организмов, функциональное состояние которых определено и однородно по своим физиологическим показателям. Это принципиально важно для получения в экотоксикологических исследованиях достоверных результатов, облегчения их интерпретации, а также для использования таких групп животных в биоэлектронных системах мониторинга контроля качества воды в реальном времени (Холодкевич, 2007).

Материалы и методы

В лабораторных условиях при контролируемых температуре и световом режиме проводили исследования на раках *Pontastacus leptodactylus* Esch, половозрелых самцах весом от 55 до 80 г. Перед экспериментами раков адаптировали к условиям содержания в течение 1–1,5 месяцев. Эксперименты на 2–3-х летних черноморских моллюсках *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 40–45 мм осуществляли *in situ* в летний период. Всех животных отбирали без явных признаков повреждений и заболеваний. У моллюсков обращали внимание на отсутствие повреждений раковины.

Первоначально об удовлетворительном функциональном состоянии раков судили по хорошо выраженной реакции опистотонуса (поднимание обеих клешней в ответ на тактильный или зрительный стимул), а у моллюсков – по защитной реакции быстрого закрытия створок при тактильном воздействии.

Кардиоритм тест-животных измеряли с помощью оригинального неинвазивного волоконно-оптического метода (Холодкевич и др., 2007; Kholodkevich et al., 2008). Хронотропные харак-

теристики кардиоактивности анализировали с использованием адаптированного для беспозвоночных животных метода вариационной пульсометрии (Kholodkevich et al., 2007, 2008). Разработанный 7-канальный волоконно-оптический фотоплетизмограф (Kholodkevich et al., 2007, 2008) позволял исследовать указанные характеристики сердечных сокращений одновременно у семи животных.

Функциональное состояние животных оценивали по характеристикам кардиоритма и его variability: частоте сердечных сокращений (ЧСС), среднеквадратичному отклонению в выборке кардиоинтервалов (СКО) и параметру вариационной пульсометрии – стресс индексу (SI), отражающему уровень напряжения регуляторных систем (Баевский, Берсенева,

1997). В качестве биохимического показателя функционального состояния раков определяли концентрацию общего белка в гемолимфе методом Лоури (Lowry et al., 1951). У моллюсков, кроме записи ЧСС, с помощью датчиков Холла (www.mosselmonitor.nl) регистрировали важнейший показатель особенностей их функционирования – движение створок.

Результаты и их обсуждение

В результате анализа данных многодневной регистрации фоновой кардиоактивности изучаемых бентосных беспозвоночных было установлено, что для здоровых животных она характеризуется наличием циркадианного ритма (рис. 1 А, Б).

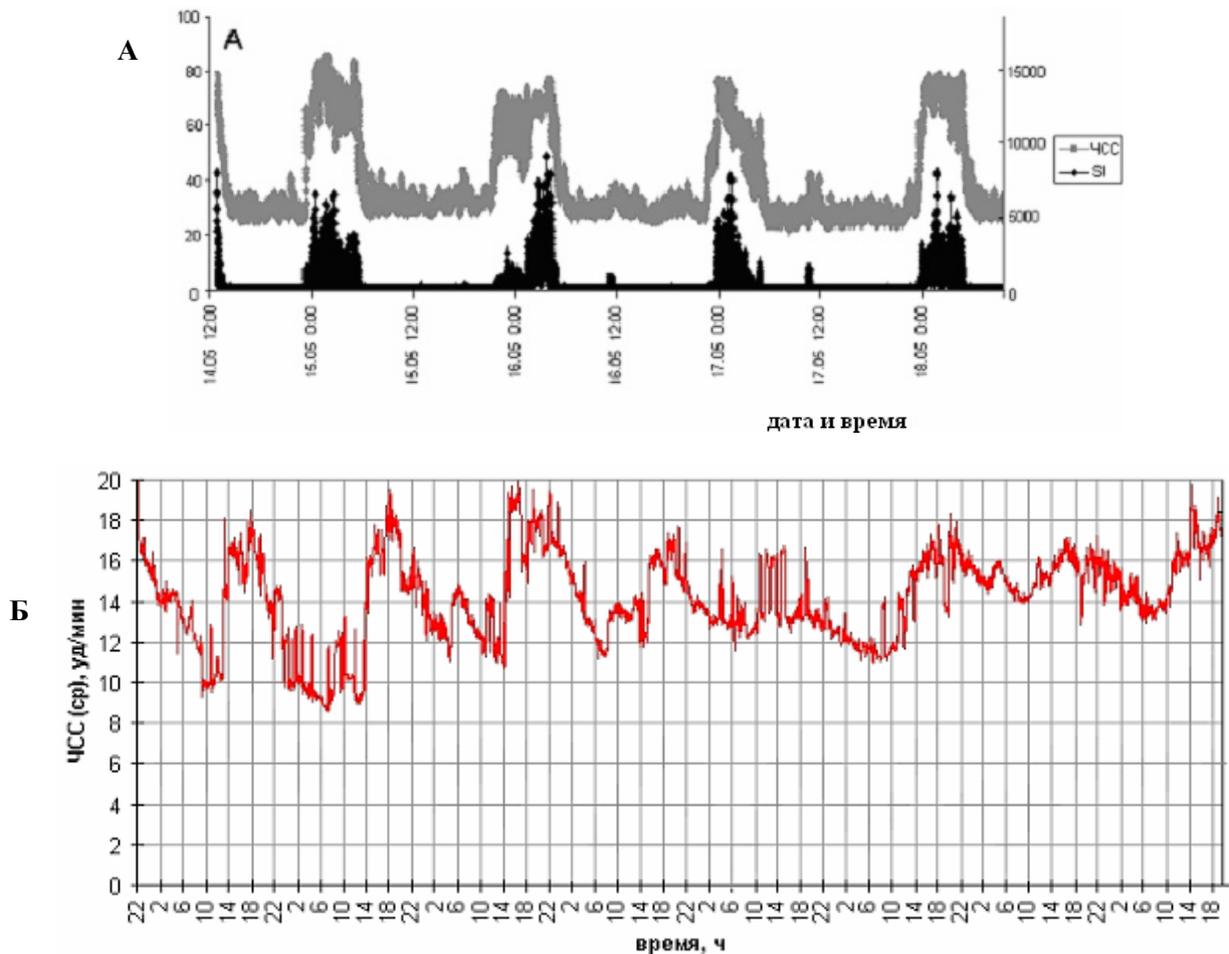


Рис. 1, А. Типичный пример циркадианного ритма кардиоактивности рака в течение 4-х суток регистрации. По осям ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – SI – стресс-индекс в усл.ед. По оси абсцисс: число, месяц, часы и мин реального времени проведения эксперимента

Рис. 1, Б. Циркадианный ритм кардиоактивности у мидий *M. galloprovincialis*, зарегистрированный в течение 9-и суток. Усредненные данные для 7 мидий. По оси ординат – ЧСС в уд/мин. По оси абсцисс – время суток в часах

Ранее при исследовании циркадианной кардиоритмики некоторых видов декапод было высказано предположение о том, что её нарушение является одним из признаков снижения адаптивных способностей организма и может указывать на плохое функциональное состояние животного (Styrishave et al., 1995; Aagaard, 1995; Bojsen et al., 1997, 1998). По результатам наших опытов (Удалова и др., 2009; Кузнецова и др., 2010) с регистрацией фоновой кардиоактивности раков *Pontastacus leptodactylus* Esch в течение многих суток при режиме освещённости близком к естественной, у здоровых животных циркадианный кардиоритм проявляется в повышении ЧСС (до 100–130%) и SI в ночной период (с 20 ч до 8 ч утра) по сравнению с дневным периодом (рис. 1А). Это соответствует ночной активности этого вида раков в природных условиях их обитания. При резких изменениях естественного светового режима или же токсических воздействиях циркадианный кардиоритм существенно нарушался. Серьёзные изменения суточной периодичности ЧСС наблюдались также непосредственно перед линькой, которая является естественным физиологическим стрессом (Удалова и др., 2009).

Наши исследования (Холодкевич и др. 2009) показали, что при нормальном функциональном состоянии моллюски *Mytilus galloprovincialis* Lam. демонстрируют наличие хорошо выраженного суточного ритма движения створок с повышением величин их раскрытия в ночное время. Отметим, что наблюдавшийся циркадианный кардиоритм у моллюсков в значительной степени определялся существенными суточными колебаниями температуры воды в летнее время.

Таким образом, хорошо выраженное и устойчивое проявление циркадианного ритма кардиоактивности (у раков) или движения створок (у моллюсков) рассматривается нами как один из надёжных показателей хорошего функционального состояния этих животных и может применяться при формировании референтных групп.

Для выявления адаптивных способностей, определяющих уровень здоровья и функциональных резервов организма, недостаточно определения характеристик кардиоактивности в покое и при спонтанном двигательном поведении. С этой целью некоторыми исследователями (Vamber et al., 1997; Баевский и др. 1997; Ярославцева, Сергеева, 2008; Холодкевич и др., 2009; Кузнецова и др., 2010) предлагается использовать функциональную нагрузку в пределах толерантности вида. При действии нагрузок,

как правило, повышаются энергетические затраты организма и существенно изменяются реакции со стороны сердечно-сосудистой системы, по сравнению с нормальными условиями. В качестве функциональной нагрузки можно использовать неповреждающие механические, физические или химические, лимитированные по силе и продолжительности, кратковременные тест-стимулы. При этом следует учитывать физиологические и поведенческие особенности исследуемого вида.

Простейшей из механических нагрузок, но практически всегда присутствующей при проведении экспериментов, является действие на животных хэндлинга. Для раков это воздействие удобно использовать в качестве тест-стимула, вызывающего генерализованную реакцию всего организма. Даже при кратковременном (1–2 мин) хэндлинге ЧСС рака при этом повышается, достигая уже через 2 мин максимальных значений, резко увеличивается и стресс-индекс. После снятия нагрузки постепенно, в течение часа, эти показатели возвращаются к исходным значениям (см. Таблицу). Усиление ЧСС в ответ на хэндлинг позволяет выявить предельные величины изменений ЧСС, SI и, в известной степени, судить об уровне напряжения регуляторных систем организма.

Критерии отбора референтных групп раков *Pontastacus leptodactylus*

Показатели функционального состояния	Диапазон значений
Вес	55–90 г
Содержание общего белка в гемолимфе	20–80 мг/мл
ЧСС в покое в дневной период (ЧССп)	24–40 уд/мин
SI в покое	1–300 усл.ед.
ЧСС в период ночной активности в циркадном ритме (ЧССа)	≥ 2ЧССп
Длительность периода ночной активности циркадного ритма	8–10 час
ЧСС при хэндлинге	60–120, уд/мин
припри хэндлинге	7000–15000, отн. ед.
ЧСС в начале теста на подвес (ЧСС нач)	≥ 2ЧССп
ЧСС в конце теста на подвес	≥ 2ЧССп – 0,30 ЧССп
ЧСС при повышении солёности среды	≥ 1,5 ЧССп
Длительность первого подъёма ЧСС при повышении солёности (NaCl) среды на 1‰.	20–30 мин

Весьма информативным тест-стимулом для раков оказалось применение специального теста на подвес (подвешивание животного на волокон-

но-оптическом кабеле в течение часа над дном аквариума в воде) (Удалова и др., 2010). Потеря контакта конечностей рака с опорой приводит животное в состояние повышенного возбуждения. Во время теста на подвес у раков быстро и значительно повышается ЧСС. Она может у разных особей оставаться на таком уровне в течение часа или же снижаться ещё при подвесе. В конкретном примере (рис. 3) ЧСС при подвесе составляла $102,08 \pm 6,87$ уд/мин, а SI равнялся 16146 ± 5993 усл.ед. Разность значений ЧСС до подвеса и в первые минуты действия нагрузки могла превышать 100%. Особо подчеркнём, что животные, у которых во время подвеса сохраняются повышенные значения ЧСС, как правило, проявляли в обычных условиях (без нагрузки) адекватные поведенческие реакции, т.е. находились в нормальном функциональном состоянии. Итак, указанный прием позволяет определять характерные для каждого животного максимальные значения ЧСС и SI, выявлять пределы устойчи-

вости кардиоритма во время «нагрузки», на основании чего можно оценивать функциональные резервы организма.

Для пресноводных и морских гидробионтов весьма удобными функциональными нагрузками является изменение солёности и/или температуры воды. На рис. 2 А приведен пример реакции со стороны кардиосистемы у здоровых раков на изменение солёности воды (1 г/л NaCl). В ответ на такое воздействие наблюдали кратковременное увеличение ЧСС и SI, величины которых постепенно приближались к фоновым значениям. На рис. 2, Б показаны результаты экспериментов на моллюсках *Mytilus galloprovincialis* Lam. со снижением естественной для них солёности морской воды (с 18 ‰ до 12 ‰). Через несколько минут после воздействия наблюдалось повышение ЧСС (как и у раков). Регистрируемая при этом реакция закрытия створок появлялась даже с меньшим латентным периодом, чем изменение ЧСС.

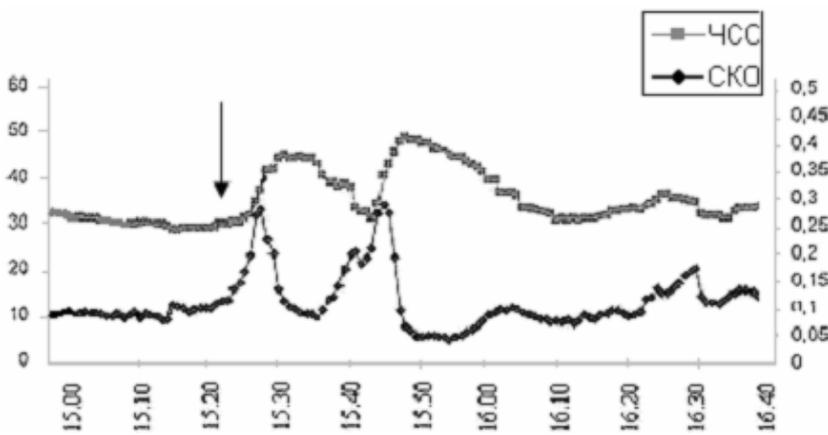


Рис. 2, А. Влияние повышения солёности (на 1‰) на характеристики кардиоактивности рака. По оси ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – СКО (среднеквадратичное отклонение) в сек. По оси абсцисс – реальное время проведения экспериментов в ч, мин. Стрелкой указан момент подачи раствора NaCl

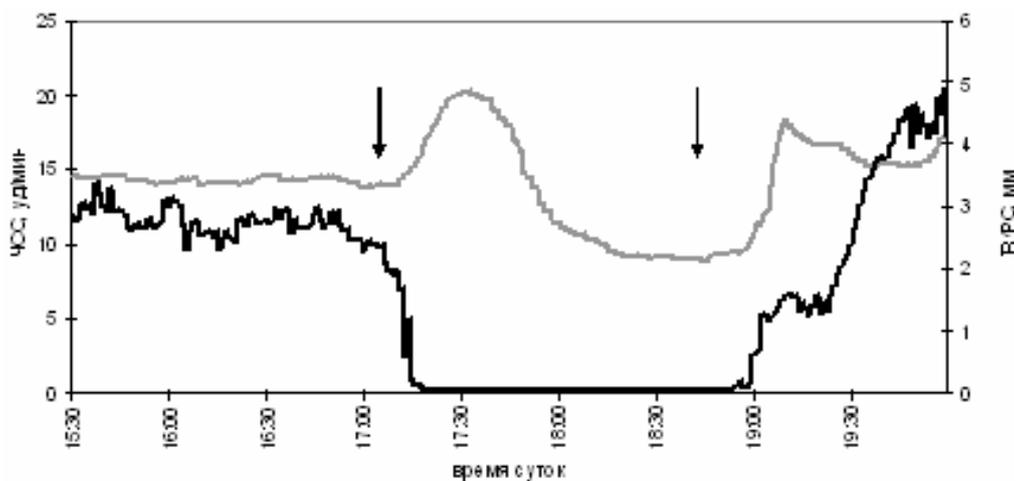


Рис. 2, Б. ЧСС и величина раскрытия створок (ВРС) при быстром изменении солёности воды (с 18 ‰ до 12 ‰ и обратно). Данные усреднены по 7 мидиям для ЧСС и по 16 мидиям для ВРС. Время подачи пресной воды и обратной замены ее на морскую отмечены стрелками. Серая линия – ЧСС (уд/мин), черная линия – ВРС (мм). По оси абсцисс – реальное время регистрации – час:мин

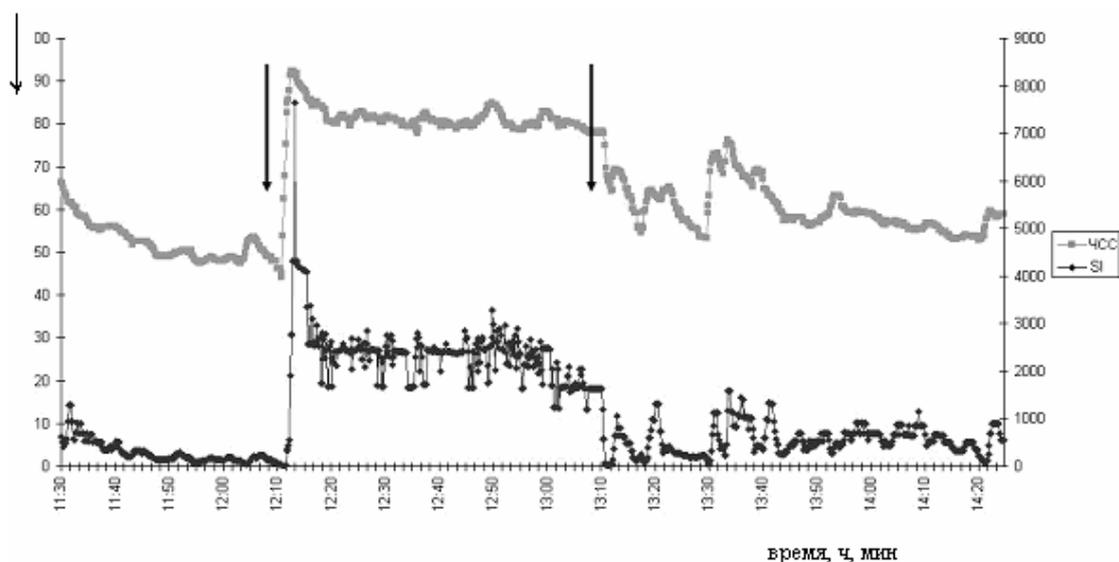


Рис. 3. Характерное для здоровых раков изменение ЧСС и SI в тесте на подвес. Стрелками указано начало и окончание теста. По осям ординат обозначения как на рис. 1, А. По оси абсцисс: время – час:мин

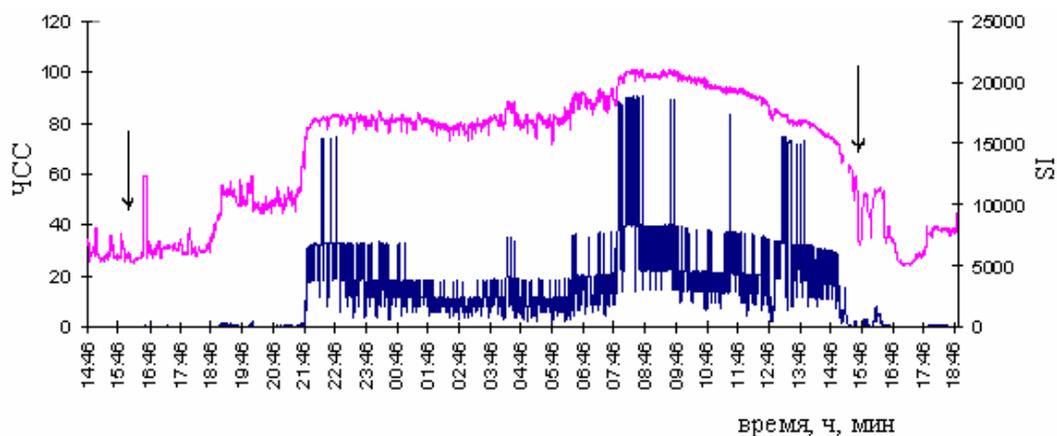


Рис. 4. Изменения кардиоактивности рака из референтной группы при воздействии гидрохинона в концентрации 1 г/л в течение суток. По оси ординат: слева – ЧСС в уд/мин, справа – SI в усл.ед. По оси абсцисс – реальное время проведения экспериментов – час:мин. Стрелками указано начало и окончание экспозиции рака в растворе гидрохинона

Для более полной оценки функционального состояния раков к комплексу приёмов, базирующихся на анализе кардиоактивности, нами был применён ещё и биохимический показатель – содержание общего белка в гемолимфе. Он позволяет косвенно оценивать доставку кислорода к органам и тканям животного. Известно, что высокий уровень белка в межлиночный период у декапод соответствует высокому уровню жизнестойкости организма и соответственно их хорошему функциональному состоянию (Depledge et al., 1995; Черкашина, 2002). В проведённом нами исследовании содержание общего белка у находившихся в хорошем функциональном состоянии раков зависело от сезона года и колебалось в

широких пределах: 20–40 мг/мл – в осенне-зимний период и 50–80 мг/мл в весенне-летний.

Результаты проведённых нами исследований на раках с использованием применявшихся нами приёмов и методов регистрации морфофизиологических показателей суммированы в таблице.

Мы полагаем, что только применение комплекса предложенных показателей позволит достаточно надёжно оценивать индивидуальные особенности функционального состояния раков. На основании указанных критериев нами были сформированы референтные группы раков, которые затем использовались при проведении экспериментов с воздействием некоторых токсикантов (гидрохинона, тяжёлых металлов и

др.). В качестве примера приведём опыты с органическим токсикантом – гидрохиноном. При воздействии гидрохинона в течение часа ЧСС и стресс-индекс увеличивались только на 20 мин. Уровень общего белка гемолимфы при этом достоверно не изменялся. При длительном (одни сутки) воздействии гидрохинон вызывал чёткую тахикардию, нарушение циркадианного ритма ЧСС (рис. 4) и уменьшение содержания белка на 40%. Подчеркнём, что выявленные в этой группе индивидуальные реакции раков по разным показателям функционального состояния, характеризовались у исследованных животных данной референтной группы лишь незначительными отличиями.

Выводы

Разработан комплексный подход к отбору тест-организмов, включающий в себя, кроме общепринятых морфометрических характеристик,

биохимические и физиологические показатели (биомаркеры), характеризующие работу сердечно-сосудистой системы. Использование его позволяет формировать по выбранным критериям однородные группы раков, сходных по физиологическим показателям а, следовательно, наиболее подходящих как для токсикологических исследований, так и для применения их в качестве биосенсоров в системах биомониторинга качества воды в режиме реального времени.

В ходе дальнейших исследований предложенный перечень критериев может быть изменён или дополнен. Очевидно, что при использовании других видов животных, критерии отбора референтных групп могут несколько отличаться, что будет отражать особенности биологии и физиологии этих организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 08-04-92424-БОНУС_а и № 10-05-00875-а.

Литература

Баевский Р. М., Берсенева А. П. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний. М.: Медицина. 1997. 234 с.

Кузнецова Т. В., Сладкова С. В., Холодкевич С. В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по характеристикам их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 42. С. 203–210.

Удалова Г. П., Федотов В. П., Иванов А. В., Е. Л. Корниенко, С. В. Холодкевич. Циркадианный кардиоритм и изменения ЧСС в тесте на подвес как критерии для определения нормального и стрессового состояния раков *Pontastacus leptodactylus*. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы III междунар. конференции. Петрозаводск. 2010. С. 180–181

Удалова Г. П., Холодкевич С. В., Сладкова С. В., Иванов А. В., Рымша В. А. Исследования циркадианной активности раков *Pontastacus leptodactylus* при их многомесячном содержании в протоке речной воды. // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2009. Т. 45(3). С. 372–381

Холодкевич С. В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. Т. 16, № 4. С. 223–232.

Холодкевич С. В., Иванов А. В., Корниенко Е. Л., Куракин А. С. Способ биологического мониторинга окружающей среды (варианты) и система для его осуществления. Бюл. изобр., 2007, № 29. Патент РФ № 2308720 С1, МПК G01N 33/18 (2006.01); G01N 21/17 (2006.01). Приоритет от 20.06.2006 г. 49 с.

Холодкевич С. В., Кузнецова Т. В., Трусевич В. В., Куракин А. С. Особенности кардиоактивности и движения створок *Mytilus galloprovincialis* Lam. в норме и при токсическом воздействии // Сборник научных трудов, посвященный 95-летию Карадагской биологической станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. С. 524–537.

Черкашина Н. Я. Динамика популяций раков родов *Pontastacus* и *Caspiastacus* (Crustacea, Decapoda, Astacidae) и пути их увеличения // М., 2002.

Ярославцева Л. М., Сергеева Э. П. Адаптивные способности личинок морских беспозвоночных при изменении естественных факторов среды как чувствительный тест на загрязнение морской воды // Биол. моря, 2008, Т. 34, № 1. С. 42–46.

Aagaard A., Warman C.G., Depledge M.H., Naylor E. Dissociation of heart rate and locomotor activity during the expression of rhythmic behaviour in the shore crab *Carcinus maenas* // Mar. Behav. Physiol. 1995. V. 26. P. 1–10.

Bamber S.D., Depledge M.H. Evaluation of changes in the adaptive physiology of shore crabs (*Carcinus maenas*) as an indicator of pollution in estuarine environments // Mar. Biol. 1997. V. 129. № 4. P. 667–672.

Bojsen B. H., Witthoff H., Styrihave B., Andersen O. Diurnal variation in physiology and behaviour of the noble crayfish, *Astacus astacus* (L.) and the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) // Special rapport. Roskilde Univ. Denmark. 1997, P. 48–61.

Bojsen B. P., Witthoff H., Styrihave B. In situ studies on heart rate and locomotor activity in the noble freshwater crayfish, (*Astacus astacus* L.) in relation to

natural fluctuations in temperature and light intensity // *Freshwater Biology*. 1998. V. 39. P. 455–465.

Depledge M.H., Aagaard A., Gyorkis P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers // *Mar. Pollut. Bull.* 1995. V. 31, N 1–3. P. 9–27.

Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randle R. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 93. P. 265–275.

Kholodkevich S.V., Fedotov V.P., Kuznetsova T.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L. Fiber-optic remote biosensor systems for permanent biological monitoring of the surface waters quality and bottom sediments in the real time // <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2007/I/I-2007.pdf>

Kholodkevich S.V., Ivanov A.V., Kurakin A.S., Kornienko E.L., Fedotov V.P. Real time biomonitoring of surface water toxicity level at water supply stations // *Environmental Bioindicators*. 2008. V. 3. № 1. P. 23–34.

Kholodkevich S.V., Kuznetsova T.V., Sladkova S.V. Criteria for selection of crayfish's reference groups in ecotoxicological investigations // *Future of Native Crayfish in Europe: Abstr.book. Písek, Czech Republic, 2009*. P. 46.

Styrishave B., Rasmusson A.D., Depledge M.H. The influence of bulk and trace metals on the circadian rhythmicity of heart rates in freshwater crayfish *Astacus astacus* // *Mar. Poll. Bull.* 1995. V. 31. P. 87–92.

www.mosselfmonitor.nl

METHODOLOGICAL APPROACHES FOR SELECTION OF REFERENCE GROUPS OF BENTHIC INVERTEBRATES BASED ON COMPLEX OF ASSESSMENTS OF THEIR FUNCTIONAL STATE

S.V. Kholodkevich, T.V. Kuznetsova, S.V. Sladkova, G.P. Udalova., V.A. Lyubimtsev

*Scientific Research Center for Ecological Safety RAS, Sankt-Petersburg, Russia
kholodkevich@mail.ru*

In the present study common criteria based on organism's functional state (FS) assessment were worked out to form reference groups of benthic animals (crayfish and bivalves) for further biomonitoring and toxicological investigations. Cardiac activity characteristics: stable expression of circadian rhythm in heart rate and stress-index, and

particular content of hemolymph total protein were suggested to be the significant parameters for functional state evaluation. Animals from selected reference groups demonstrated similar responses being exposed to toxicant. It was shown that criteria and methods for selection of reference groups could increase the reliability of toxicological studies results.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИНЕЙНО-ВЕСОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК С АКТИВНОСТЬЮ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ В БЕЛЫХ МЫШЦАХ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП СИГОВ ИЗ ОЗЕРА КАМЕННОЕ (РЕСПУБЛИКА КАРЕЛИЯ)

М. В. Чурова, О. В. Мещерякова, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук
Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,
e-mail: mchurova@yandex.ru.

Введение

Исследование особенностей роста рыб, механизмы формирования размерно-весовой изменчивости является одним из важных вопросов в популяционной биологии, биохимии рыб, аквакультуре (Дгебуадзе, 2001, Huss et al., 2007, Huss et al., 2008). Рыбы растут в течение всей жизни, и особи одной популяции, одной когорты могут отличаться темпами роста в зависимости от различных факторов, что приводит к формированию вариаций размеров в группе рыб одного поколения и популяции в целом. Рыбы разные по размерам отличаются между собой и по уровню метаболизма вследствие различных энергетических затрат на рост, развитие и другие процессы жизнедеятельности. Многочисленные исследования показывают, что некоторые ферменты энергетического и углеводного обмена являются индикаторами интенсивности и направления важнейших путей энергетического и пластического обмена, и определение их активности может использоваться в оценке роста и развития рыб, их физической активности. В исследованиях взаимосвязи биохимических параметров с размерными характеристиками рыб (масса и длина) большое внимание уделяется ферментам белых мышц, участвующим в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ (Somero, Childress, 1990; Burness et al., 1999; Norton et al., 2000, Tripathi, 1999; Tripathi, Verma, 2004; Davies, Moyes, 2007). У рыб, мышцы составляют большую часть тела (около 60% веса) и, таким образом, играют большую роль в метаболизме всего организма и отражают темпы роста всего тела рыбы. Скелетная мышца выполняет не только локомоторную функцию, но

и играет важную роль в метаболическом гомеостазе всего тела (Sanger and Stoiber, 2001; McClelland G.B. et al., 2006). Целью нашего исследования был поиск взаимосвязей активности и уровня экспрессии генов ферментов энергетического и углеводного метаболизма белых мышц с размерами рыб внутри возрастных групп (2+ и 3+) сига (*Coregonus lavaretus* L.), обитающих в озере Каменное (республика Карелия). Также для описания ростовых процессов во взаимосвязи с размерами в белых мышцах рыб определяли уровень экспрессии тяжелой цепи миозина и показатель РНК/ДНК, используемые в исследованиях для оценки темпов роста рыб (Houlihan et al., 1993; Grant, 1996, Peragon et al., 2001, Overturf and Hardy, 2001, Imsland et al., 2006).

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили сиги (*Coregonus lavaretus* L.) разных возрастных групп выловленные в озере Каменное и озере Тумасозеро в июне 2009 года (табл. 1).

Таблица 1. Линейно-весовые характеристики сига из озера Каменное

		2+	3+
АС, см	M±m	18.96±0.27	20.5±0.28
	min-max	17,6–19,7	19,6–21,4
масса, г	M±m	56.86±2.38	84.71±4.9
	min-max	50,00–67,00	73–110
Количество особей		9	9

Олиготрофное озеро Каменное относится к бассейну реки Кеми (басс. Белого моря). Площадь водоёма составляет 95,5 км², максимальная глубина – 26 м, средняя 8 м. Вода озера ха-

рактируется высокой прозрачностью, малой минерализацией (9,5 мг/л) и низким содержанием органических соединений (общий азот – 0,41 мг/л, общий фосфор – 0,005 мг/л). содержание кислорода – 6,5 мг/л. Вследствие низкой минерализации и невысокой интенсивности биологических процессов вода озера отличается низкими величинами рН (5.97–6.49) (Поверхностные воды..., 2001).

Сиги из озера Каменное относятся к мелкой форме малотычковых сигов. Особи отличаются смешанным типом питания. По частоте встречаемости из бентосных организмов доминируют (около 50%) личинки хиромид, подёнок, моллюски. Планктон представлен главным образом ветвистоусыми рачками, веслоногие рачки малочисленны.

Сбор рыбы осуществлялся разноячеистыми сетями в литоральной зоне на глубине 2–6 метров. Температура воды была 11 °С.

Определение активности ферментов. Активность ферментов определяли в белых мышцах и печени сигов. Ткань гомогенизировали в 0.01 М. трис-НСl буферном растворе (рН 7.5). Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, 1.1.1.27), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, 1.1.1.49), 1-глицерофосфатдегидрогеназы (1-ГФДГ, 1.1.1.8), малатдегидрогеназа (МДГ, 1.1.1.37) в печени и мышцах определяли по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Активность альдозы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Векс в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность цитохром с оксидазы (цитохромоксидаза, ЦО, КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Смита (Smith, 1955), при этом цитохром с восстанавливали двукратным по массе количеством аскорбиновой кислоты в 0.02 М фосфатном буферном растворе (рН 7.0) в течение 2 ч и затем на колонке с сефадексом G-25 выделяли в восстановленной форме свободным от избытка восстановителя.

Определение концентрации РНК и ДНК. Тотальную РНК выделяли из белых мышц по Хомчински и Сакхи (Chomczynski, Sacchi, 1987) с помощью набора «для выделения тотальной РНК Yellow Solve» (Клоноген, С.-Петербург). ДНК белых мышц выделяли методом Альанаби и Мартинеса (Aljanabi, Martinez, 1997). Концентрации РНК и ДНК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр «SmartSpec Plus», BioRad, США) (Маниатис, 1984).

Проведение полимеразной цепной реакции. Уровень экспрессии генов тяжелой цепи миозина, цитохром с оксидазы и лактатдегидрогена-

зы-А определяли в белых мышцах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед/мл) (Силекс, Россия). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексонуклеотидов (набор «Синтез первой цепи ДНК», Силекс). Концентрацию кДНК измеряли спектрофотометрически. Амплификацию проводили на приборе i-Cycler с оптической приставкой IQ5 (BioRad) с использованием реакционной смеси 2.5 x для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I (Синтол, Россия). Праймеры подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.0. В связи с отсутствием данных по нуклеотидным последовательностям исследуемых генов для сигов, использовали генетические базы данных для лосося (*Salmo Salar L.*). Последовательности праймеров следующие: тяжелая цепь миозина *MyHC* (GenBank DN164736) прямой 5' – TTCAGTGGCGTGCTTCTC – 3', обратный 5' – AAGAGGCTGGAGGATGAGG – 3'; лактатдегидрогеназа-A4 (*LDHA4*): прямой 5' – CGTTGACATCCTGACCTAC – 3', обратный 5' – TCTCCGTGCTCTCCAATG – 3' (GenBank BT043598); цитохром с оксидаза субъединица IV (CCOIV): прямой 5'-TACGTGGGGCACATGGTGT – 3', обратный 5' – CCCAGGAGCCCTTCTCCTTC – 3' (GenBank BT043749); фактор элонгации *EF-1* (GenBank AF321836) прямой 5' – TGCTGGTGGTGGTGGTGGAG – 3', обратный 5' – AAACGCTTCTGGCTGTAGGG – 3'. Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95 °С 5 мин; повторяющиеся циклы (50): денатурация ДНК при 95 °С 20 с, отжиг праймеров при 59 °С по 30 с, элонгация ДНК при 72 °С по 30 с; с последующей процедурой плавления фрагментов ДНК. Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой (Gahr et al., 2008). Уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *EF-1*. Данные выражались как отношение концентрации мРНК исследуемого гена к концентрации мРНК *EF-1*.

Сравнение выборок по исследуемым показателям оценивали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Степень влияния исследуемых факторов оценивали при помощи многофакторного дисперсионного анализа MANOVA. Взаимосвязь исследуемых показателей с размерами особей и между собой оценивали при помощи линейной

регрессии и корреляционного анализа по Спирмену (Юнкеров, Григорьев, 2002).

Результаты и обсуждение

Корреляция активностей ферментов в белых мышцах с линейно-весовыми характеристиками сигов. Согласно результатам исследования наблюдалась положительная взаимосвязь активности ферментов ЛДГ, ЦО, МДГ, альдолазы с длиной и массой сигов обеих возрастных групп (табл. 2).

Цитохром *c* оксидаза, ключевой фермент дыхательной цепи, и малатдегидрогеназа, фермент цикла трикарбоновых кислот, в исследованиях используются как показатели аэробного обмена (Goolish, Adelman, 1987; Merrit, Quattro, 2003; Gauthier et al., 2008, Koedijk et al., 2010). Основным источником энергии служит аэробный обмен, высокий уровень которого отражается на проявлении активной жизнедеятельности организма, особенно в период роста и развития молоди рыб (Озернюк 2000).

Таблица 2. Регрессионные уравнения зависимости исследуемых показателей в белых мышцах от длины и массы тела сигов двух возрастных групп

ФЕРМЕНТ (Y)	ВОЗРАСТ	X	УРАВНЕНИЕ	R2	R	P
ЦО	2+	длина	$y = -13.797 + 0.815x$	0.73	0.85	<0.01
		масса	$y = -3.243 + 0.086x$	0.59	0.77	0.01
	3+	длина	$y = -2.549 + 0.184x$	0.51	0.71	<0.05
		масса	$y = -0.061 + 0.015x$	0.85	0.92	0.001
ЛДГ	2+	длина	$y = -3935.24 + 238.38x$	0.64	0.80	< 0.01
		масса	$y = -1022.19 + 28.162x$	0.66	0.81	<0.01
	3+	длина	$y = -1197.29 + 73.165x$	0.58	0.76	< 0.05
		масса	$y = -3.571 + 3.734x$	0.39	0.62	<0.05
Г-6-ФДГ	2+	длина	$y = -4.055 + 0.237x$	0.50	0.71	<0.05
		масса	$y = -0.792 + 0.022x$	0.30	0.55	НД
	3+	длина	$y = 4.801 - 0.218x$	0.42	-0.65	<0.05
		масса	$y = 1.154 - 0.01x$	0.30	-0.49	НД
1-ГФДГ	2+	длина	$y = -27.822 + 1.965x$	0.63	0.79	0.01
		масса	$y = -1.522 + 0.192x$	0.44	0.66	<0.05
	3+	длина	$y = -43.815 + 2.457x$	0.75	0.87	<0.01
		масса	$y = -1.577 + 0.1x$	0.31	0.56	НД
МДГ	2+	длина	$y = -5.538 + 0.470x$	0.55	0.74	<0.05
		масса	$y = 0.625 + 0.048x$	0.42	0.65	< 0.05
	3+	длина	$y = -15.332 + 0.889x$	0.71	0.84	<0.01
		масса	$y = -0.254 + 0.038x$	0.34	0.58	< 0.05
Альдолаза	2+	длина	$y = -651.468 + 41.386x$	0.61	0.78	0.01
		масса	$y = -96.485 + 4.022x$	0.42	0.79	<0.05
	3+	длина	$y = -83.958 + 8.926x$	0.47	0.69	<0.05
		масса	$y = 45.446 + 0.647x$	0.63	0.79	0.01

Ранее было показано, что активность ферментов аэробного обмена (Цитратсинтаза и цитохромоксидаза) коррелирует с темпами роста рыб (Mathers et al., 1992, Couture et al., 1998, Lemeux et al., 2003). Продуцируемая в аэробном процессе энергия АТФ может быть затрачена на компенсацию повышенных энергетических затрат на синтез структурных белков, ферментов. Так как белые мышцы составляют большую часть веса рыб, где главным образом происходит синтез белков для растущей рыбы, то высокий уровень аэробного метаболизма необходим для поддержания высокого темпа роста (Couture et al., 1998, Gauthier et al., 2008).

Активность фермента лактатдегидрогеназы в белых мышцах рыб связана преимущественно с участием в анаэробном гликолизе, кото-

рый является главным процессом энергообеспечения при интенсивных сокращениях мышц. Согласно данным литературы, активность ферментов гликолиза лактатдегидрогеназа и пируваткиназа в мышцах увеличивается с массой тела разных видов рыб: клариевого сома (Tripathi. 1999a, 1999b), радужной форели (Somero, Childress, 1990; Burness et al., 1999) некоторых видов морских окуней (Norton et al. 2000, Davies, Moyes, 2007), пятнистой зубатки (Immland et al., 2006), ювенильных особей Атлантической трески (Koedijk et al., 2010). Повышение активности ферментов гликолиза в белых мышцах у более крупных особей, видимо, связано с необходимостью поддержания необходимого уровня энергии для совершения интенсивных рывковых дви-

жений. Кроме того, в обеих возрастных группах наблюдалась корреляция между активностью ферментов ЦО и ЛДГ (табл. 3), что также указывает на взаимосвязанное усиление процессов аэробного и анаэробного обмена с

размерами особей. Такая же взаимосвязь активности ферментов ЛДГ и ЦО в белых мышцах с массой и длиной рыб была показана нами раньше на ряпушке и форели (Мещерякова и др., 2008, Чурова и др., 2010).

Таблица 3. Значения коэффициентов корреляции между активностью исследуемых ферментов мышц сигах двух возрастных групп

	ЛДГ		Г6ФДГ		1-ГФДГ		МДГ		альдолаза	
	2+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	3+
ЦО	0.86*	0.82*	0.79*	-0.2	0.94*	0.90*	0.83*	0.4	0.86*	0.88*
ЛДГ			0.09	-0.8	0.43	0.8	0.93*	0.4	0.90*	0.49
Г-6-ФДГ					0.90*	-0.5	0.95*	-0.3	0.26	-0.4
1-ГФДГ							0.97*	0.68*	0.61	0.79*
МДГ									0.94*	0.81*

* Достоверные значения коэффициентов корреляции при $p < 0,05$.

Алльдолаза, фермент гликолиза и глюконеогенеза. Значение активности изофермента альдолазы А, определяемого в нашем исследовании, характеризует уровень использования углеводов в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ. Положительная взаимосвязь активности альдолазы с массой и весом особей (табл. 2), а также с ферментами ЦО, ЛДГ и МДГ (табл. 3) свидетельствует о связанном с размерами увеличении использования углеводов в энергообеспечении мышц.

1-Глицерофосфатдегидрогеназа фермент челночного механизма, играет важную роль в поддержании баланса НАД/НАДН. По нашим данным в обеих возрастных группах сигах наблюдалась положительная взаимосвязь 1-ГФДГ с массой и длиной особей (табл. 2), а также с активностью ЦО и МДГ (табл. 3). Таким образом, с увеличением энергозатрат у более крупных особей также усиливается функционирование глицерол-фосфатного челночного механизма, обеспечивающего по-

ступление восстановительных эквивалентов в дыхательную цепь.

Нами была проведена возрастная динамика активности этих ферментов. В возрасте 3+ по сравнению с возрастом 2+ происходило снижение активности ЦО, МДГ, 1-ГФДГ, альдолазы, активность ЛДГ достоверно не изменялась (рис. 1). Это указывает на снижение уровня аэробного обмена с возрастом. Ранее на сигах было также показано снижение активности аэробных ферментов (ЦО и цитратсинтазы) у взрослых особей по сравнению с сеголетками (Hinterleitner et al., 1987). Наблюдаемые различия в активности ферментов белых мышц с возрастом являются результатом изменения двигательного режима и типа метаболизма в онтогенезе. В ходе развития рыб с увеличением массы происходит снижение интенсивности потребления кислорода, снижение тканевого дыхания и, в целом, уровня стандартного обмена (Озернюк, 1985, Goolish, 1995).

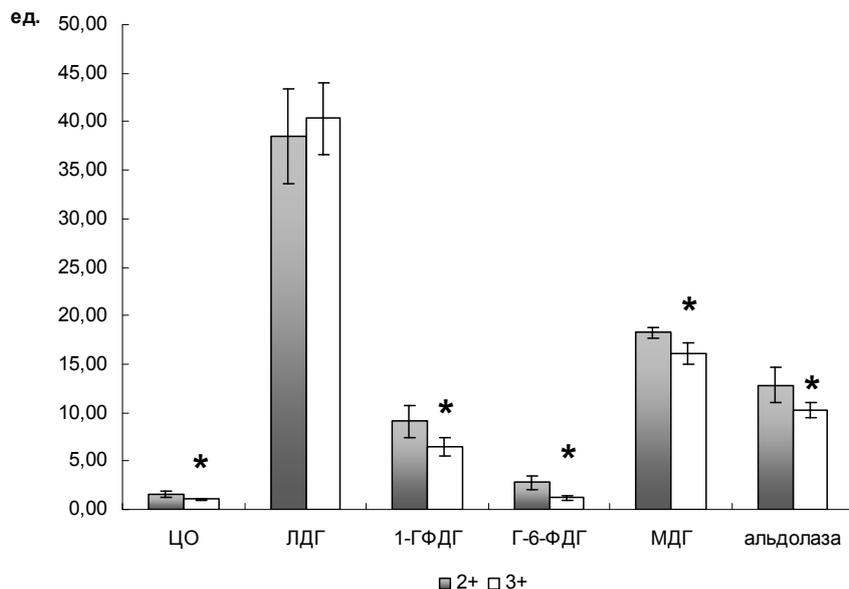


Рис. 1. Активность ферментов в белых мышцах сигах 2+ и 3+ ($M \pm m$) (мкмоль/мин/мг белка, для ЛДГ и альдолазы: мкмоль*10⁻¹/мин/мг белка, для ЦО- к/мг белка)

* Достоверность различий при $p \leq 0.05$.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ), индикатор пентозо-фосфатного пути. В результате цикла происходит образование пентоз, участвующих в дальнейшем синтезе нуклеиновых кислот, а также восстановительных эквивалентов НАДФН, необходимых для биосинтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, сфинголипидов. В различных органах и тканях пентозо-фосфатный путь имеет разную интенсивность (Tian et al., 1998). В нашем исследовании достоверных значений зависимости активности Г-6-ФДГ в мышцах с массой не наблюдалось, а значение коэффициента корреляции с длиной в возрасте 3+ менялись с положительно на отрицательное (табл. 2). С возрастом активность фермента также снижалась (рис. 1). Взаимосвязь активности Г-6-ФДГ с ферментами аэробного обмена наблюдалась только в мышцах сигов в возрасте 2+, у четырехлеток корреляции не обнаружено (табл. 3). Таким образом, данные по активности Г-6-ФДГ указывают на то, что в более старшем возрасте происходит перераспределение расходования углеводов в сторону энергообеспечения, а не восстановительных процессов.

Взаимосвязь экспрессии генов LDH-A и CCO с размерами рыб и активностью этих ферментов. Одним из важных вопросов биологии является исследование механизмов регуляции концентрации ферментов во взаимосвязи с размерами тела. Регуляция синтеза ферментов de novo осуществляется на уровне транскрипции или на посттранскрипционном уровне (Burness et al., 1999). В последнее время появляется всё больше исследований по изучению экспрессии генов аэробных и анаэробных ферментов и их взаимосвязи с активностью ферментов и размерами тела (Yang, Somero, 1996, Burness et al., 1999, Davies, Moyes, 2007).

Согласно нашему исследованию наблюдалась положительная корреляция уровня экспрессии генов *LDH-A* и *CCO* с размерами тела (табл. 4). У сигов в возрасте 3+ значения коэффициентов корреляции были достоверны только с массой. Кроме того в обеих возрастных группах взаимосвязь активности этих ферментов с уровнем экспрессии генов была положительной (табл. 4). Данные результаты свидетельствуют о регуляции активностей ферментов на уровне транскрипции, связанной с размерно-весовой дифференциацией рыб. Уровень экспрессии гена *LDH-A* с возрастом усиливался, а гена *CCO* с возрастом достоверно не изменялся (рис. 2).

Уровень экспрессии тяжелой цепи миозина. Миозин является одним из основных белков в мышце и составляет 25% от общего содержания белка всего организма (Weiss et al., 1999; Baldwin and Haddad, 2001) и 50% от количества всех мышечных белков (Watabe and Ikeda, 2006). Выбранная для исследования изоформа тяжелой цепи миозина относится ко второму классу миозинов. Белки второго класса, которые считаются собственно миозинами, экспрессируются в поперечно-полосатых мышцах и непосредственно участвуют в сокращении (Regiani and Bottinelli., 2008). Расположение и обильность этих протеинов в белой мышце, делает их идеальными кандидатами для оценки роста рыб. У рыб ген тяжелой цепи миозина экспрессируется в течение всей жизни (Hevroy et al., 2006; Regiani and Bottinelli., 2008). Было показано, что экспрессия гена *MyHC* коррелирует с темпами роста некоторых видов рыб и может быть использован как показатель, отражающий закономерности прироста мышечной массы (Overturf and Hardy., 2001, Hevroy et al., 2006, Imsland et al., 2006, Dhillon R. et al., 2008).

Таблица 4. Регрессионные уравнения зависимости содержания мРНК *CCO* и мРНК *LDH-A4* в белых мышцах от длины и массы тела сигов двух возрастных групп

ПОКАЗАТЕЛЬ (Y)	ВОЗРАСТ	X	УРАВНЕНИЕ	R2	R	P
мРНК <i>CCO</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -5.967 + 0.377X$	0.53	0.73	< 0.05
		МАССА	$Y = -1.109 + 0.040X$	0.44	0.66	< 0.05
	3+	ДЛИНА	$Y = -1.817 + 0.129X$	0.20	0.44	НД
		МАССА	$Y = -0.127 + 0.012X$	0.44	0.67	< 0.05
мРНК <i>LDH-A4</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -14.303 + 0.808X$	0.62	0,79	0.01
		МАССА	$Y = -5.098 + 0.107X$	0.80	0,89	0.001
	3+	ДЛИНА	$Y = -14.0034 + 0.806X$	0.26	0.51	НД
		МАССА	$Y = -4.956 + 0.089X$	0.81	0.90	0.001
мРНК <i>CCO</i>	2+	АКТИВНОСТЬ ЦО	$Y = 0.369 + 0.493X$	0.82	0.91	0.001
	3+		$Y = 0.193 + 0.569X$	0.67	0.84	0.01
мРНК <i>LDH-A4</i>	2+	АКТИВНОСТЬ ЛДГ	$Y = -0.605 + 0.003X$	0.65	0.81	<0.01
	3+		$Y = -1.145 + 0.012X$	0.34	0.58	< 0.05

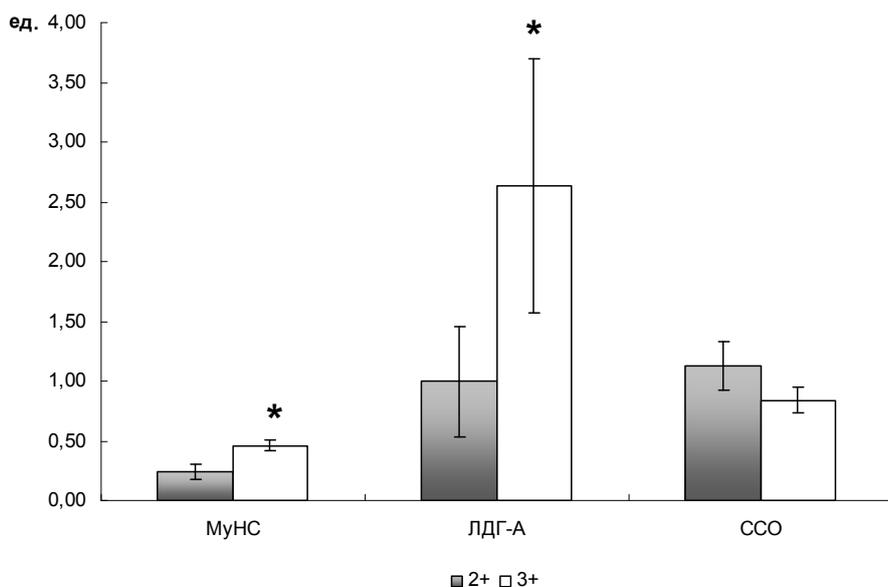


Рис. 2. Уровень экспрессии генов (мРНК исследуемого гена / мРНК *EF-1*) в белых мышцах сигах двух возрастных групп (M±m).

* Достоверность различий при $p \leq 0.05$

Согласно результатам нашего исследования уровень экспрессии гена *MyHC* положительно коррелировал с массой и длиной тела сигах из озера Каменное не зависимо от их возраста (табл. 5). При этом значение коэффициентов корреляции, а также уровень экспрессии гена миозина с возрастом увеличивались (рис. 2). Данные результаты указывают, на то, что более большие особи отличаются большим темпом прироста мышечной массы. Вероятно, что у четырёхлеток сигах прирост скелетной мускулатуры и массонакопление

происходят более интенсивно, чем у трёхлеток.

Отмеченная положительная корреляция активности цитохром *c* оксидазы и ЛДГ, а также уровня экспрессии генов этих ферментов с уровнем мРНК *MyHC* (табл. 6), указывают на увеличение энергетических потребностей по мере увеличение процессов прироста мышечной массы. Ранее также было показано, что для рыб существует положительная корреляция между общей активностью ЛДГ и приростом мышечной массы (Ahmad, Hasnain, 2005; Guderley, 2004).

Таблица 5. Регрессионные уравнения зависимости уровня экспрессии гена *MyHC*, показателя РНК/ДНК в белых мышцах от длины и массы тела сигах двух возрастных групп

ПОКАЗАТЕЛЬ (Y)	ВОЗРАСТ	X	уРАВНЕНИЕ	R2	R	P
мРНК <i>MyHC</i>	2+	ДЛИНА	$Y = -0.349 + 0.030X$	0.34	0.58	<0.05
		МАССА	$Y = -0.091 + 0.005X$	0.68	0.82	0.001
	3+	ДЛИНА	$Y = -3.876 + 0.216X$	0.81	0.90	<0.01
		МАССА	$Y = -0.701 + 0.015X$	0.84	0.92	0.001
РНК/ДНК	2+	ДЛИНА	$Y = 4.481 - 0.195X$	-0.49	-0.70	НД
		МАССА	$Y = 1.870 - 0.019X$	-0.55	-0.74	НД
	3+	ДЛИНА	$Y = -2.160 + 0.158X$	0.66	0.82	< 0.01
		МАССА	$Y = 0.526 + 0.007X$	0.35	0.58	< 0.05

Таблица 6. Корреляция некоторых исследуемых показателей с уровнем экспрессии гена *MyHC* в мышцах сигах двух возрастных групп

	мРНК <i>MyHC</i>	
	2+	3+
ЦО	0.12	0.92*
ЛДГ	0,33	0.79*
мРНК <i>LDH-A4</i>	0.66*	0.94*
мРНК <i>ССО</i>	0.36	0.80*
РНК/ДНК	-0.57	0.64*

* Достоверные значения коэффициентов корреляции при $p < 0,05$.

Показатель РНК/ДНК. Многочисленными исследованиями показано, что концентрация РНК в тканях прямо связана с уровнем синтеза белка (Houlihan, 1991, Houlihan, 1993, Vinagre et al., 2008). Количество рибонуклеиновой кислоты, выражаемой как мг РНК мг-1 ДНК (отношение РНК/ДНК) используется как биохимический показатель роста в разных контекстах как для пресноводных, так и для морских видов рыб (Grant, 1996, Chicharo, Chicharo, 2008). Индекс РНК/ДНК отражает уровень синтеза протеинов на клетку, тогда как уровень клеточной РНК варьирует в зависимости от

уровня синтеза протеинов, в то время как содержание ДНК остается постоянным (Buckley, 1984).

Было показано, что РНК/ДНК и РНК/протеин положительно коррелирует с темпами роста лососёвых (Wang et al., 1993, Widler, Stanley, 1982, Crant, 1996) и других видов рыб (Rooker, Holt, 1996, Mathers et al., 1992; Houlihan et al., 1993; Peragon et al., 2001). В нашем исследовании значение коэффициента корреляции индекса РНК/ДНК с размерами особей варьировало между возрастными группами. Положительная корреляция показателя с массой тела наблюдалась только в возрасте 3+, в возрасте 2+ значение коэффициента корреляции было отрицательное (табл. 5). Значение показателя увеличивалось с возрастом (с $0,61 \pm 0,06$ до $1,04 \pm 0,14$, $p \leq 0.05$), при этом концентрация белка в мышцах ткани также повышалась ($24,78 \pm 4,83$ до $30,65 \pm 2,35$ мг/г ткани, $p \leq 0.05$). Таким образом можно заключить, что уровень синтеза белка у рыб в возрасте 3+ выше, чем в возрасте 2+. Кроме того была отмечена положительная корреляция показателя РНК/ДНК с уровнем экспрессии гена *MyHC* у четырёхлеток (табл. 6). Это ещё раз подтверждает наше предположение об усилении роста (главным образом прироста мышечной ткани) с увеличением размеров рыб в более старшем возрасте. Согласно данным литературы взаимосвязь показателя РНК/ДНК с размерами рыб может быть как положительной (Azuma et al., 1998, Rooker, Holt, 1996, Tripathi, Verma, 2004b), так и отрицательной (Buckley and Lough, 1987, Houlihan et al., 1993), что, вероятно, зависит от стадии развития,

возраста, условий обитания исследуемых рыб, сезона (Grant G.C., 1996).

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет выявить некоторые закономерности энергетических и пластических процессов в мышцах при формировании размерно-весовой разнокачественности у сигов в разных возрастных группах (у сигов в возрасте 2+ и 3+). У более больших рыб усиливаются аэробный и анаэробный обмен, что связано с увеличением энергетических затрат как на обеспечение локомоторной активности, так и на процессы роста особей, прирост мышечной массы. С возрастом и размерами происходит увеличение экспрессии тяжелой цепи миозина, что свидетельствует о том, что у четырёхлеток прирост скелетной мускулатуры и массонакопление происходят более интенсивно, чем у трёхлеток. Наши результаты показывают, что значение уровня экспрессии гена миозина, в отличие от показателя РНК/ДНК, более чётко отражает процессы роста сигов и взаимосвязь их с размерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ-3731.2010.4; гранта РФФИ 08-04-01140, программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России на 2009–2011 гг.» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» проект НК-28(12).

Литература

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж., 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 480 с.
- Озернюк Н. Д., 2000. Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во МГУ. 259 с.
- Чурова М. В., Мещерякова О. В., Немова Н. Н., Шагуновский М. И., 2010. Соотношение роста и некоторых биохимических показателей рыб на примере микижи *Parasalmo mykiss* Walb. // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 3. с. 289–299.
- Ahmad R, Hasnain A.U., 2005. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. V. 140. P. 271–8.
- Azuma T., Yada T., Ueno Y., Iwata M., 1998. Biochemical approach to assessing growth characteristics in salmonids // *NPAFC Bull. No. 1*. – P. 103–111.
- Buckley L.G., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea // *Mar. Biol*. V. 80. P. 291–298.
- Baldwin K.M., Haddad F., 2001. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle: Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle // *J. Appl. Physiol*. V. 90. P. 345–357.
- Burness G.P., Leary S.C., Hochachka P.W., Moyes, C. D., 1999. Allometric scaling of RNA, DNA, and enzyme levels in fish muscle // *Am. J. Physiol*. V. 277. P. R1164–R1170.
- Chicharo M.A., Chicharo L., 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology // *Int J Mol Sci*. V. 9. P. 1453–1471.
- Davies R., Moys C.D., 2007. Allometric scaling in centrarchid fish: origins of intra- and inter-specific variation in oxidative and glycolytic enzyme levels in muscle // *The Journal of Experimental Biology*. V. 210. P. 3798–3804
- Dhillon R.S., Wang Y., Tufts B.L., 2008. Using molecular tools to assess muscle growth in fish: Applications for aquaculture and fisheries management // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. V. 148. P. 452.

Gauthier C, Campbell P, Couture P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* V. 151. P. 526–532.

Gahr S.A., Vallejo R.L., Weber G.M., Shepherd B.S., Silverstein J.T., Rexroad C.E.3rd., 2008. Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Physiol Genomics*. V. 32. P. 380–392.

Goolish, E.M., Adelman, I.R., 1987. Tissue specific cytochrome *c* oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // *Physiological Zoology*. V. 60. P. 454–464.

Grant G.C., 1996. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult brown trout // *Journal of Fish Biology*. N48. P. 1223–1230.

Guderley H., 2004. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: impact of temperature and energetic status // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* V. 139. P. 371–382.

Hevroy E.M., Jordal A-E.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G-I, Olsvik P.A., 2006. Myosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture*. V. 252. P. 453–461.

Houlihan D.F., Mathers E.M., Foster A., 1993. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: *Fish Ecophysiology* / J.C. Rankin, F.B. Jensen. London UK: Chapman and Hall. P. 45–71.

Huss M., Bystrom P., Persson L., 2008. Resource heterogeneity, diet shifts and intra-cohort competition: effects on size divergence in YOY fish // *Oecologia*. V. 158. P. 249–257.

Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G., Ditlecadet D., Sigurosson S., Foss A. 2006. Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolfish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for

monitoring growth rates // *Can J. Fish Aquat. Sci.* V. 63. P. 1959–1967.

Koedijk R.M., Le Francois N.R., Blier P.U., Foss A., Folkvord A., Ditlecadet., Lammare S.G., Stefansson S.O., Imsland A.K., 2010. Ontogenetic effects of diet during early development on growth performance, myosin mRNA expression and metabolic enzyme activity in Atlantic cod juveniles reared at different salinities // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. V. 156. P. 102–9.

Overturf K., Hardy R., 2001. Myosin expression levels in trout muscle: a new method of monitoring specific growth rates for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) on varied planes of nutrition // *Aquat. Res.* V. 32. P. 315–322.

Reggiani C., Bottinelli R., 2008. Myosin II: Sarcomeric myosins, the motors of contraction in cardiac and skeletal muscles / (Ed.) L.M. Coluccio. Myosins. Netherlands: Springer. P. 125–169.

Somero G.N., Childress J.J., 1990. Scaling of ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit // *J.exp. Biol.* V. 149. P. 319–333.

Tripathi G., 1999 (a). Scaling of some metabolic enzymes in liver of freshwater teleost: an adaptive mechanism // *Z. Naturforsch.* V. 54 c, P. 1103–1106.

Tripathi G., 1999 (b). Scaling of cytoplasmic and mitochondrial enzymes and proteins in skeletal muscle of a catfish // *J.Anim.Physiol. a. Anim.Nutr.* 83, p. 50–56

Tripathi G., Verma P., 2004. Scaling effects on metabolism of a teleost // *Experimentall Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. V. 301A. P. 718–726

Watabe S., Ikeda D., 2006. Diversity of the pufferfish *Takifugu rubripes* fast skeletal myosin heavy chain genes // *Comp. Biochem. Physiol.* V. 1D. P. 28–34.

Yang T., Somero G.N., 1996. Activity of lactate dehydrogenase but not its concentration of messenger RNA increases with body size barred sand bass, *Paralabrax nebulifer* (Teleostei) // *Biol. Bull.* V. 191. P. 155–158.

RELATIONSHIP BETWEEN GROWTH CHARACTERISTICS, ACTIVITIES OF SEVERAL ENZYMES AND GENETIC-MOLECULAR PARAMETERS IN WHITE MUSCLE OF WHITEFISH OF DIFFERENT AGES FROM LAKE KAMENNOE (REPUBLIC OF KARELIA)

M.V. Churova, O.V. Meshcheryakova, N.N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: mchurova@yandex.ru*

The present study was designed to elucidate the relationship between the several biochemical parameters with weight and length of fish. We studied, activities of cytochrome *c* oxidase (CCO), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 1-glycerophosphate dehydrogenase (α GPDH), expression levels of several genes (*LDH-A*, *CCO-IV*, Myosin heavy chain (*MyHC*), RNA/DNA ratio in white muscles of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) of two age group (2+, 3+) from Lake Kamennoe (Republic of

Karelia). Relationships between studied parameters were also estimated.

According to the results of research activities of LDH, CCO, MDH, 1GPDH, expression levels of *LDH-A* and *CCO* genes in muscle were well correlated with length and weight of fishes within each age cohort. There were differences in relationship of RNA/DNA with weight and length between fish groups. Relationship between *MyHC* expression level in white muscle and growth characteristics of fish was positive for whitefish of both ages.

ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ АРТЕМИИ НА ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В. Г. Шайда, Е. Н. Скуратовская, И. И. Руднева

*Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, Украина,
e-mail: svg-41@mail.ru*

Изучали действие УФ-облучения (источник облучения – бактерицидная лампа КВАРЦ-24) на артемию *Artemia* sp. Показатели выклева личинок из облученных цист превышали таковые у интактных яиц. Параметры теплопродукции рачков, подвергнутых действию УФ-радиации, были в 2 раза ниже по сравнению с таковыми у контрольных особей (7.36 ± 0.34 против 15.40 ± 2.37 соответственно), что свидетельствует о существенном нарушении энергетического баланса у облученных артемий. Обсуждается вопрос о возможных последствиях усиления интенсивности ультрафиолетовой радиации для водных организмов.

Введение

Ультрафиолет обладает большей энергией фотона, чем остальное излучение, достигающее поверхности Земли. Биологические эффекты УФ-радиации проявляются на всех уровнях организации живой материи – от молекулярного до биосферного. УФ-излучение повреждает биомолекулы, прежде всего нуклеиновые кислоты и белки, инициирует окислительные процессы, в результате которых образуются свободные радикалы, поражающие клеточные мембраны и другие структурные компоненты клеток и тканей, что в ряде случаев приводит к их гибели или канцерогенезу (Diffey, 1991)

УФ-излучение влияет не только на наземные экосистемы, но и проникает в воду. Его эффекты при этом зависят от физико-химических свойств воды и глубины. Известно, что ультрафиолет А (320–400 нм) в океанических экосистемах может проникать на глубину до 23 м, а наиболее опасный ультрафиолет В (290–320 нм) – на глубину до 7–12 м, где в основном происходит размножение и развитие рыб, морских беспозвоночных и интенсивный фотосинтез. Для многих гидробионтов, особенно на ранних стадиях развития, даже малые

дозы УФ-радиации являются губительными (Zagarese, Williamson, 2001; Wrona et al., 2006).

Так как УФ-излучение приводит к деструкции биологических молекул и тем самым нарушает состояние обменных процессов, то для выяснения механизмов его действия наиболее адекватную информацию можно получить при анализе биохимических параметров. Однако, их изменения не всегда четко выражены и имеют одинаковую направленность, вектор откликов во многом зависит от концентрации действующего фактора и физиологического состояния организма. Следует учитывать также, что все биохимические измерения возможны только после гибели животных, что вносит дополнительный стрессовый фактор. В связи с этим особую значимость приобретают такие тест-системы, которые позволяют оценить биологические эффекты неблагоприятных факторов, включая УФ-радиацию, прижизненно в течение достаточно короткого времени, не травмируя тест-объект. Для этих целей существует ряд подходов, в частности, анализ поведенческих реакций, выживаемости и т.д. Одним из наиболее чувствительных методов является микрокалориметрия, позволяющая с высокой точностью измерить общий метаболизм организма и его изменения прижизненно.

Известно, что жизнедеятельность организма связана с переходом одних видов энергии в другие, что сопряжено с выделением и поглощением тепла. Исследование тепловых процессов живых систем позволяет проанализировать такие важнейшие свойства объекта как теплоемкость, теплопроводность, внутренняя энергия, энтальпия, энтропия, а также их изменения под действием различных, в том числе неблагоприятных факторов. В связи с этим теплопродукция организма является интегральным параметром, реагирующим даже на незначительные изменения окружающей среды.

Водные организмы очень чувствительны к флуктуациям условий обитания. Вариации биотических и абиотических факторов вызывают сдвиги обмена веществ, влияют на рост, развитие, поведение, плодовитость и воспроизводство гидробионтов. Проблема приобретает особое значение в настоящее время в связи с глобальными изменениями на планете, что приводит к существенным, порой необратимым нарушениям жизнедеятельности обитателей водных систем. В связи с этим своевременная и адекватная оценка их состояния и разработка соответствующих методов для этого приобретает все большую значимость и актуальность.

Метод микрокалориметрии позволяет изучать процессы ранних сдвигов обменных реакций гидробионтов в прижизненном состоянии. В изменяющихся условиях среды и адаптаций к ним происходит интенсивное поглощение кислорода, усиление энергетического обмена, смена энергетических субстратов, изменение степени проницаемости клеточных мембран. Все эти реакции оказывают существенное влияние на проявление метаболической активности, которую можно определить с помощью метода микрокалориметрии на Мониторе биологической активности ТАМ 2277 (Швеция, LKB). Получаемые при этом термограммы фиксируют с высокой степенью точности теплопродукцию организма в течение определенного заданного времени.

На этом основании целью настоящей работы явилось исследование биологических эффектов УФ-радиации у артемии *Artemia sp.* как традиционными методами, так и с помощью метода микрокалориметрии.

Материалы и методы исследований

Сухие цисты артемии, собранные в январе 2010 г. в Сакском озере (Крым, Украина), облучали бактерицидной лампой Кварц-240 с диапазоном излучения 280–400 нм на расстоянии 10, 50 и 100 см от источника излучения. Время облучения составило 30, 60 и 120 секунд. Контролем служили необлученные цисты. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Определяли процент выклева науплиусов из цист, который рассчитывали как отношение выклюнувшихся личинок к общему числу цист через 48 часов инкубации в воде (соленость 18‰) в камере Богорова.

Проводили также облучение взрослых особей артемии в течение 10 минут на расстоянии 1

м от поверхности воды. После воздействия рачков помещали в микрокалориметр для анализа теплопродукции.

Определение теплопродукции проводили на Мониторе биологической активности ТАМ 2277 (Thermometric 2277 Thermal Activity Monitor, LKB, Швеция) при $+20^{\circ}\text{C}$ в течение 50 часов. Артемию помещали в ампулу, содержащую 2 мл стерильной морской воды. В качестве холостой пробы использовали стерильную морскую воду, против которой проводили измерение теплового потока. Обе ампулы устанавливали в Монитор для измерения теплопродукции. Одновременно в таких же условиях содержали рачков для контроля их состояния. В опытной и контрольной группе исследовали по 5 особей, величину теплопродукции выражали в мкВт/особь. Результаты обрабатывали статистически по (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что УФ-облучение цист артемии в малых дозах вызывало увеличение выклева науплиусов почти в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 1). Максимальный выклев происходил при облучении цист в течение 120 секунд на расстоянии 100 см от источника. Вместе с тем наблюдаемые эффекты носили нелинейный характер. Выклев личинок возрастал через 30 секунд после воздействия на цисты, находящиеся на всех трех расстояниях от источника облучения, затем несколько снижался после 60-минутного воздействия. Вылупление науплиусов из яиц, облученных в течение 120 сек на расстоянии 10 и 50 см от лампы, имел сходные значения с предыдущим вариантом, тогда как число личинок, выклюнувшихся из цист, облученных на расстоянии 100 см от лампы, достоверно увеличивалось. Таким образом, кратковременное УФ-облучение цист артемии в малых дозах стимулировало выклев науплиусов, но отклики при этом носили нелинейный характер.

Типичные термограммы взрослых рачков приведены на рисунке 2. Интенсивное движение артемии в ампуле продолжалось в течение 20–30 часов (в отдельных случаях до 40 час), после чего активность снижалась, теплопродукция резко падала, и рачок погибал. Как видно на рисунке, уровень теплового потока у облученных артемий значительно ниже по сравнению с контрольными особями, также как и их двигательная активность. Результаты статистического анализа теплопродукции приведены в таблице.

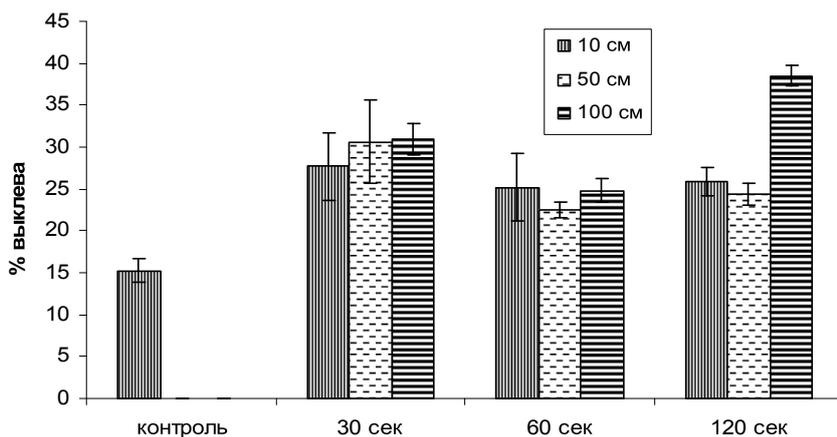


Рис. 1. Выдуление науплиусов артемии ($M \pm m$) после УФ-облучения цист (источник облучения – бактерицидная лампа Кварц-240)

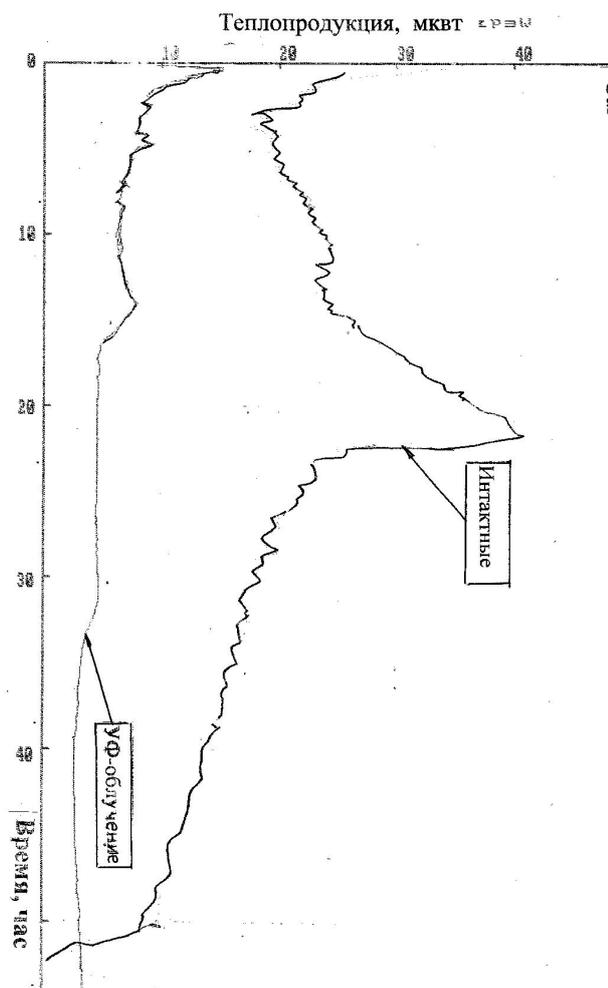


Рис. 2. Типичные термограммы взрослых особей артемии, полученные на Мониторе биологической активности ТАМ-2274

Из приведенных данных можно заключить, что теплопродукция рачков, подвергнутых действию УФ-облучения, в 2 раза ниже по сравнению с соответствующими параметрами интактных особей. Достоверное уменьшение теплового потока отмечено также у облученных артемий в расчете на мг массы. Максимальная теплопродукция была снижена у опытных рачков по сравнению с контрольными.

Таким образом, увеличение выклева личинок из облученных цист свидетельствует о стимулирующем эффекте малых доз УФ-облучения, что было отмечено и для других видов воздействия на организмы (Бурлакова и др., 2004). Значительное снижение теплопродукции у облученных рачков связано с разбалансированием процессов генерации и утилизации энергии, что может быть обусловлено повреждением митохондрий и нарушением протекающих в них метаболических реакций (Wu et al., 2007). В то же время нельзя исключать и изменения уровня свободнорадикальных процессов, инициируемых УФ-излучением, что также может существенно повлиять на состояние энергетического обмена ракообразных. Известно, что ультрафиолетовое облучение рыб в экспериментальных условиях значительно сокращает содержание глутатиона в коже и в мышцах, увеличивает концентрацию супероксидрадикала и перекиси водорода, ТБК-реактивных продуктов, что сопряжено с развитием окислительного стресса (Charron et al., 2007).

Показатели теплопродукции артемии ($M \pm m$, $n=5$), подвергнутой действию УФ-облучения
(источник облучения – бактерицидная лампа Кварц-240, время 10 мин, расстояние 1 м)

Показатели теплопродукции	Контроль	Опыт	Достоверность различий, p
Средняя теплопродукция, мкВт/ особь	15.40±2.37	7.36±0.34	< 0.01
Средняя теплопродукция, мкВт/ мг массы	3.08±0.15	1.47±0.06	< 0.05
Максимальная теплопродукция, мкВт/ особь	36.3±2.3	15.1±3.4	< 0.01

Таким образом, снижение теплопродукции является неспецифическим комплексным ответом гидробионтов на действие УФ-облучения, а параметры теплопродукции – чувствительным индикатором состояния организма, подвергнутого действию ультрафиолета. Уменьшение теплового потока было отмечено нами ранее у личинок артемии, вылупившихся из облученных яиц (Шайда, Руднева 2004). Полученные данные могут быть использованы в мониторинге состояния гидробионтов, обитающих в акваториях, подверженных высокой инсоляции, а также для контроля дозы УФ-облучения, применяемой для обеззараживания воды в условиях аквакультуры. В этом случае реакция является универсальной и неспецифической, однако весьма чувствительной, так как отклики фиксировали при достаточно низких дозах УФ-радиации.

Выводы

1. Кратковременное УФ-облучение цист артемии в малых дозах стимулировало выклев науплиусов, но отклики при этом носили нелинейный характер.

2. Теплопродукция рачков, подвергнутых действию УФ-облучения, в 2 раза ниже по сравнению с соответствующими параметрами интактных особей, что связано с разбалансированием процессов генерации и утилизации энергии.

3. Показатели теплопродукции гидробионтов, подвергнутых действию УФ-радиации, отражают комплексный ответ и могут служить эффективным биоиндикатором для оценки состояния организма в неблагоприятных условиях и использоваться в мониторинговых программах и исследованиях состояния окружающей среды и ее обитателей.

Литература

Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы // Биофизика, 2004, Т. 49 (3), С. 551–564.

Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 250 с.

Шайда В. Г., Руднева И. И. Влияние ультрафиолетового облучения на артемию (*Artemia salina* L.) // «Вісник Одеського національного університету», 2004. Т. 9, вип.5. С. 133–139.

Charron R.A., Fenwick J. C., Lean D.R.S., Moon W. Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish *Brachydanio rerio*. // Photochem. and Photobiol. 2007, V. 72. P. 327–333.

Diffey B.L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems // «Physics in Medicine and Biology», 1991, V. 36(3), P. 299–328.

Wrona F.J., Prowse T.D., Reist J.D., Hobbie J.E., Levesque L.M.J., Macdonald R.W., Vincent W.F. Effects of Ultraviolet radiation and contaminant-related stressors on Arctic freshwater ecosystems // «Ambio», 2006, V. 35, N 7, P. 388–401

Wu Y., Xing D., Liu L., Chen T., Chen W.R. Fluorescence response energy transfer analysis of bid activation in living cells during ultraviolet-induced apoptosis. // Biochem. Biophys. Acta., 2007, V. 39(2), P. 37–45.

Zagarese, H.E., Williamson C.E. The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries // «Fish and Fisheries», 2001, V. 2, P. 250–260.

RESPONSES OF ARTEMIA ON UV-RADIATION

V.G. Shaida, E.N. Skuratovskaya, I.I. Rudneva

*Institute of the Biology of the Southern Seas National Ukrainian Academy of Sciences, Sevastopol,
e-mail: svg-41@mail.ru*

The effects of UV-irradiation (source was bactericide lamp KWARTZ-240) on *Artemia* sp. were studied. The hatching value of treatment cysts were higher as compared with the intact specimen. Heat production of irradiated adults was in 2-fold

lower than in control (7.36 ± 0.34 vs 15.8 ± 2.37 respectively), that caused of the significant damage of energetic balance in irradiated crustacea. The consequences of UV-radiation increase for marine organisms is discussed.

АКТИВНОСТЬ ЭТОКСИРЕЗОРУФИН-О-ДИЭТИЛАЗЫ (ЭРОД) РЫБ КАК БИОМАРКЕР ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ СТОЙКИМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ ЗАГРЯЗНЯЮЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

В. В. Юрченко, Г. М. Чуйко

*Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН,
п. Борок, Ярославская обл., Россия
e-mail: viksapiksa@mail.ru*

Органические загрязнители водных объектов в большинстве своём представлены липофильными ксенобиотиками. В связи с этим они способны легко проникать через клеточные мембраны жабр, кожи, органов пищеварительной системы, что обуславливает их высокую биодоступность для рыб. Последующая судьба и биологические эффекты чужеродных соединений в значительной степени зависят от возможности их включения в процесс биотрансформации. Биотрансформация липофильных соединений состоит из двух фаз. В первой фазе (phase I), оксидативной, главная роль принадлежит оксигеназным системам, которые, окисляя гидрофобные молекулы ксенобиотика, увеличивают его водорастворимость. Во второй фазе (phase II) продукты оксигеназных реакций конъюгируют с различными водорастворимыми эндогенными соединениями посредством трансфераз (и некоторых других групп ферментов) и удаляются экскреторными органами (Di Giulio et al., 1995).

Биотрансформация ксенобиотиков является функциональным звеном более общего процесса в живой системе – увеличения полярности окисляемых молекул, по этому пути происходит превращение гидрофобных эндогенных соединений (стероидов, длинноцепочечных жирных кислот и др.). Поэтому оксигеназы также получили название «оксидазы смешанных функций». Универсальной оксидазой, обнаруженной у представителей животного, растительного и бактериального миров, является цитохром P450 (Арчаков, 1983). К настоящему времени выделено множество его форм (Kadlubar, Kadlubar, 2010). Известно, что P450-содержащие ферментные системы обладают выраженной субстратной специфичностью, хотя некоторые из них трансформируют относительно широкий спектр субстратов (Katagi, 2010).

Возможно, никаким другим монооксигеназам не было уделено такого большого внимания как подсемейству CYP1A-содержащих оксигеназ (cytochrome P450 family 1 subfamily A), так как оно играет ключевую роль в биотрансформации планарных галогенированных и полициклических ароматических углеводородов, а также структурно сходных соединений. Попадая в организм рыб, эти ксенобиотики вызывают индукцию CYP1A, которая проявляется в повышении активности этоксирезорифин-О-диэтилазы (ЭРОД) (Sarasquete, Segner, 2000).

ЭРОД, как и остальные P450-содержащие ферменты, является мембраноассоциированным белком эндоплазматического ретикулума. Монооксигеназная система ЭПР, вероятно, состоит из трёх компонентов: НАДФН-специфичный протеид, цитохром b5 и цитохром P450 (Арчаков, 1983).

На субклеточном уровне наибольшая ЭРОД-активность отмечается в микросомальной фракции. На клеточно-тканевом – максимальную индукцию CYP1A демонстрирует эндотелий (Smolowitz et al., 1991; Stegeman et al., 1991). На уровне органов и их систем в организме рыб CYP1A-содержащие ферменты концентрируются главным образом в печени, но они обнаружены также в почках, селезёнке, жабрах, коже, пищеварительном тракте, коре надпочечников, сердце, гонадах, обонятельной системе, мозге, красной мускулатуре (Di Giulio et al., 1995; Sarasquete, Segner, 2000).

Ксенобиотики вызывают индукцию ферментов-трансформаторов, активируя транскрипцию генов. Обычно ксенобиотик считают индуктором, если он активирует ядерный рецептор, тем самым вызывая увеличение экспрессии генов-мишеней этого рецептора. В неактивированном

состоянии арил-углеводородный рецептор (AhR) находится в цитоплазме, в комплексе с димером БТШ 90, кошапероном p23, иммунофилин-подобным белком, называемым белком, взаимодействующим с AhR (AIP, известный также как ARA9 или XAP2). Во время активации этого комплекса лигандом Ah-рецептор отделяется и перемещается к ядру, где образует гетеромер с AhR-ядерным переносчиком (ARNT). AhR-ARNT гетеродимеры связываются с ДНК-последовательностями в 5'-регуляторных областях генов-мишеней и взаимодействуют с различными коактиваторами, корепрессорами, и (или) основными факторами транскрипции, определяя таким образом скорость транскрипции генов. Последовательности ДНК, которые связываются с AhR-ARNT, называют элементами, способными реагировать с ксенобиотиками (xenobiotic-responsive elements, XRE) (Ripp, 2008).

Немало усилий было затрачено для определения потенциальных индукторов CYP1A. В частности QSAR-модели (quantitative structure-activity relationship models), или модели количественного отношения «структуры – активности», основанные на понимании того, что химическая структура соединения коррелирует с определённым процессом, таким как биологическая активность (или химическая активность), а также анализы конкурентного связывания (competitive binding assays) с использованием меченых лигандов. В результате этих исследований, например, были установлены молекулярные размеры потенциальных лигандов: $12\text{Å} \times 14\text{Å} \times 5\text{Å}$ (Whyte et al., 2000).

Индукторами CYP1A являются несколько классов химических соединений. Полихлорированные дибензо-п-диоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) – планарные хлорированные углеводороды, которые широко распространены в окружающей среде. Эти два класса представлены 75 и 135 конгенерами, соответственно. Наиболее хорошо изученный в этой группе 2,3,7,8-ТХДД – одно из наиболее токсичных соединений, когда-либо произведённых человеком, и наиболее сильный индуктор. Ещё одна группа хлорированных углеводородов, вызывающая индукцию CYP1A – это полихлорированные бифенилы (ПХБ), представленные 209 конгенерами. Снятые с производства во многих странах, они и по сей день циркулируют в природной среде благодаря своей устойчивости и способности к биоаккумуляции. Сильными индукторами среди конгенеров являются ПХБ 77 (3,3',4,4'-тетрахлоробифенил), ПХБ 126

(3,3',4,4',5-пентахлоробифенил), ПХБ 169 (3,3',4,4',5,5'-гексахлоробифенил). Полибромированные бифенилы (ПББ) являются структурными гомологами ПХБ и представлены тем же числом конгенеров. Этот класс соединений исследован значительно меньше в контексте индукции CYP1A. То же самое можно сказать и о полихлорированных терфенилах. Хорошо изученными индукторами ЭРОД-активности являются полиароматические углеводороды. Несмотря на то, что существуют естественные источники поступления ПАУ в среду, загрязнение водных экосистем происходит в основном по вине человека. Индукция ЭРОД химическими соединениями этого класса характеризуется очень сильными межвидовыми различиями. AhR-лигандами являются и хлорорганические пестициды. Рыбы, отловленные в водоёмах, имеющих связь с сельскохозяйственными землями, демонстрируют повышенные уровни ЭРОД. Такой класс загрязнителей как тяжёлые металлы не обладает характеристиками потенциальных индукторов CYP1A, однако установлено, что некоторые металлы могут изменять степень активности ЭРОД, индуцированной AhR-лигандами. Кадмий может повышать активность, индуцированную ПАУ, а медь – понижать. Биотоксины, такие как бревитоксин, имеют некоторую способность вызывать индукцию CYP1A-ферментных систем у рыб. *Pytochodiscus brevis*, относящийся к динофлагеллятам, продуцирует этот липофильный нейротоксин в больших количествах во время «цветения» (Whyte et al., 2000).

Одним из основных достоинств ЭРОД-анализа в целях биомониторинга является его способность указывать на воздействие многокомпонентных химических смесей, как, например, стоки целлюлозно-бумажного производства. Индуцированная ЭРОД-активность отловленной «в природе» рыбы может быть использована для индикации присутствия AhR-лигандов, что позволит исключить дорогостоящие анализы тканей, воды и донных отложений. Понимание существующих ограничений используемого в мониторинге инструмента даст возможность надлежащим образом трактовать результаты (Whyte et al., 2000).

Многие индукторы могут быть и ингибиторами CYP1A-индукции (при очень высоких концентрациях). В случаях, когда есть подозрение на ингибирование ЭРОД-активности уместно использовать в качестве метода оценки воздействия контаминантов измерение CYP1A-белка или м-РНК (Sarasquete, Segner, 2000)

В целом, к преимуществам ЭРОД-анализа относят то, что он служит своеобразным «детектором» присутствия AhR-активирующих соединений. В результате «быстрого» метаболизма многих полиароматических и некоторых полигалогенированных углеводородов методы аналитической химии не в состоянии выявить эти соединения в тканях рыб, тогда как ЭРОД-активность обеспечивает чёткое свидетельство присутствия планарных контаминантов в организме. Уровень индукции ЭРОД может служить основанием для определения биологического потенциала ксенобиотика, быть индикатором биохимических и физиологических изменений. ЭРОД-активность отражает и кумулятивное воздействие AhR-агонистов, безотносительно к тому приводят они к токсическому процессу, или нет (Whyte et al., 2000).

Индукцированная ЭРОД-активность может многократно возрастать по сравнению с базовым уровнем. В целях сравнения результатов исследований сложилась условная градация ЭРОД-индукции на «слабую» (ЭРОД-активность возрастает до 10 раз по сравнению с контролем), «умеренную» (от десяти- до стократного повышения уровней ЭРОД) и «сильную» (активность фермента увеличивается более чем в 100 раз) (Whyte et al., 2000).

Говоря об определении ЭРОД-активности у рыб, важно подчеркнуть, что этот показатель является очень нестабильным и чувствительным к манипуляционным процедурам. Существует ряд приёмов для минимизации потерь активности фермента. Важно быстро обрабатывать пойманную рыбу, так как стресс запускает выброс глюкокортикоидов (например, кортизола), что повышает уровни ЭРОД (Devaux et al., 1992). Печень от живой рыбы следует помещать в жидкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) для хранения проб до момента анализа. Приготовление гомогената ткани необходимо осуществлять в ледяном буфере и на льду. Далее процедура представляет из себя получение постмитохондриального супернатанта (гомогенат центрифугируют при 9000–13500 g от 20 до 25 минут), а затем – выделение микросомального осадка (супернатант центрифугируют при 100000–200000 g от 50 до 60 минут). Полученный микросомальный осадок ресуспендируют в буфере. Таким образом, проведения ЭРОД-анализа подразумевает наличие следующего лабораторного оборудования: гомогенизатор, центрифуга и ультрацентрифуга – для получения микросомальной фракции, спектрофлуориметр – для измерения конечного продукта ре-

акции. В основе анализа ферментативной активности лежит реакция диэтилирования 7-этоксирезорурфина. В качестве кофактора используется НАДФ восстановленный. Продукт реакции, резорурфин, является флуоресцентным и имеет максимумы возбуждения и испускания при длинах волн 530 и 580 нм, соответственно (Burke, Mayer, 1974; Whyte et al., 2000). ЭРОД-активность измеряется как количество резорурфина, приходящегося на мг белка в образце микросомальной фракции печени рыбы в минуту времени реакции (моль/мг/мин) (Pohl, Fouts, 1980).

Прежде чем делать выводы о качестве среды на основании данных ЭРОД-анализа и использовать активность фермента в целях биомониторинга, необходимо установить, в каких пределах она изменяется у массовых видов рыб и от каких факторов зависит в нормальных условиях.

Для решения этой проблемы необходимы лабораторные исследования, направленные на оценку конститутивной (базовой) активности фермента, а также уровней его индукции ксенобиотиками. Например, было показано (Förlin, Celander, 1993), что у окуня при базовой ЭРОД-активности 440 пмоль/мг/мин внутривентральные инъекции в дозе 500 мг/кг Clophen 50 (ПХБ) и 50 мг/кг β -нафтофлавона (ПАУ) вызвали индукцию до уровня 1100 пмоль/мг/мин и 2560 пмоль/мг/мин, соответственно. У щуки после инъекции β -нафтофлавона в такой же дозе уровень ЭРОД возрос с 480 пмоль/мг/мин до 4660 пмоль/мг/мин. Абсолютные показатели ЭРОД-активности, без сомнения, в некоторой степени будут отличаться от исследования к исследованию. Основными факторами, определяющими флуктуацию ЭРОД-активности, являются репродуктивная стадия особи (Stegeman, Hahn, 1994), а также сезонные изменения температуры воды и доступность пищи. Замечено, что поступление индукторов в организм рыб зависит от температуры и характеризуется следующими особенностями: в большей степени ксенобиотиками аккумулируются при высокой температуре воды и в меньшей степени выводятся из организма при низкой температуре (Collier et al., 1978).

Ключевым аспектом в выборе вида для мониторинговых исследований является не сама по себе индуцированная ЭРОД-активность, а в большей степени – устойчивая конститутивная ЭРОД-активность и значительная амплитуда между конститутивной и индуцированной ЭРОД-активностью, что позволяет однозначно интерпретировать результаты (Flamarion, Garric, 1997).

Литература

- Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. М.: Наука, 1983. 56 с.
- Bock K. W., Lipp H. P., Bock-Hennig B. S. Induction of drug-metabolising enzymes by xenobiotics // *Xenobiotica*. 1990. Vol. 20. No 11. P. 1101–1111.
- Burke M.D., Mayer R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene // *Drug Metabolism and Disposition*. 1974. Vol. 2. P. 583–588.
- Collier T.K., Thomas L.C., Malins D.C. Influence of environmental temperature or disposition of dietary naphthalene in coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*): isolation and identification of individual metabolites // *Comp. Biochem. Physiol.* 1978. Vol. 61. P. 23–28.
- Devaux A., Pesonen M., Monod G., Andersson T. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes // *Biochemistry and Pharmacology*. 1992. Vol. 43. P. 898–901.
- Di Giulio R.T., Benson W.H., Sanders B.M., Van Veld P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity // Rand G.M. (ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment*. Washington: Taylor & Francis, 1995. Ch. 17. P. 523–561.
- Flammarion P., Garric J. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? // *Chemosphere*. 1997. Vol. 35. No. 10. P. 2375–2388.
- Förlin L., Celander M. Induction of cytochrome P4501A in teleosts: environmental monitoring in Sweden fresh, brackish and marine waters // *Aquatic Toxicology*. 1993. Vol. 26. P. 41–56.
- Kadlubar S., Kadlubar F. F. Enzymatic Basis of Phase I and Phase II Drug Metabolism // Pang K. S. et al. (eds.) *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions*. 2010. P. 3–25.
- Katagi T. Bioconcentration, Bioaccumulation, and Metabolism of Pesticides of Aquatic Organisms // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010. Vol. 204. P. 1–132.
- Norrgren L., Andersson T., Björk M. Liver morphology and cytochrome P450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos // *Aquatic Toxicology*. 1993. Vol. 26. P. 307–316.
- Pohl R.J., Fouts J.R. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions // *Analytical Biochemistry*. 1980. Vol. 107. P. 150–155.
- Ripp S. L. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes: Contrasting Roles in Detoxification and Bioactivation of Drugs and Xenobiotics // Elfarra A. A. (ed.) *Advances in Bioactivation Research*. 2008. P. 69–102.
- Sarasquete C., Segner H. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies // *The Science of the Total Environment*. 2000. Vol. 247. No 2–3. P. 313–332.
- Smolowitz R. M., Hahn M. E., Stegeman J. J. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450IA1 induced by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzoafuran in liver and extrahepatic tissues of the teleost *Stenotomus chrysops* (scup) // *Drug Metabolism and Disposition*. 1991. Vol. 19. No 1. P. 113–123.
- Stegeman J. J., Smolowitz R. M., Hahn M. E. Immunohistochemical localization of environmentally induced cytochrome P450IA1 in multiple organs of the marine teleost *Stenotomus chrysops* (Scup) // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1991. Vol. 110. No 3. P. 486–504.
- Stegeman J.J., Hahn M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species // Malins D.C. and Ostrander G.K. (eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. P. 87–206.
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure // *Critical Reviews in Toxicology*. 2000. Vol. 30. Is. 4. P. 347–570.
- Williams D.E., Lech J.J., Buhler D.R. Xenobiotics and xenoestrogens in fish: modulation of cytochrome P450 and carcinogenesis // *Mutation Research*. 1998. Vol. 399. P. 179–192.

ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE (EROD) ACTIVITY IN FISH AS A BIOMARKER OF WATER POLLUTION WITH PERSISTENT ORGANIC CONTAMINANTS

V.V. Yurchenko, G.M. Chuiko

*Papanin Institute of Biology of Inland Waters, Russian Academy of Science, Borok, Yaroslavl region,
Russia* IBIW RAS, Borok, Russia,
viksapiksa@mail.ru

CYP1A-dependent monooxygenases are known to be metabolizing enzymes of many xenobiotics, such as PCDDs, PCDFs, PCBs, PAHs and structurally related compounds. EROD activity in fish being an indicator of CYP1A-induction is a well-established *in vivo* biomarker for

environmental pollution. EROD activity approach is based on the measurement of ethoxyresorufin deethylation product, resorufin, in liver microsomal fraction.

Научное издание

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

ТОМ I

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ**

сборник научных статей

*Печатается по решению Ученого совета
Учреждения Российской академии наук
Института биологии
Карельского научного центра РАН*

Сдано в печать 01.12.2010. Формат 60x84¹/₈. Гарнитура Times.
Печать офсетная. Уч.-изд. л. 33,5. Усл. печ. л. 37,2.
Тираж 150 экз. Изд. № 153. Заказ № 917.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
Петрозаводск, пр. А. Невского, 50