

**Отделение биологических наук РАН
Научный Совет по гидробиологии и ихтиологии РАН
Российский фонд фундаментальных исследований
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тюменский государственный университет»**

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ**

**МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**Борок
2012**



Российская Академия Наук

Р А С



Отделение биологических наук РАН

Научный Совет по гидробиологии и ихтиологии РАН

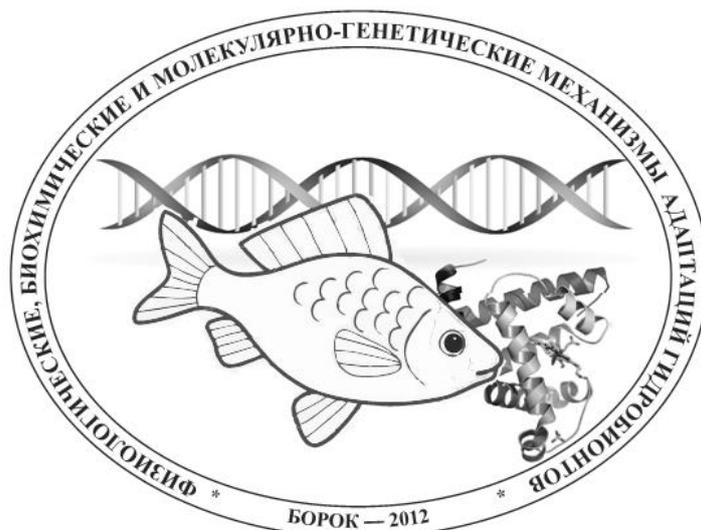
Российский фонд фундаментальных исследований

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тюменский государственный университет»**

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ

Материалы Всероссийской конференции с международным участием



Борок 2012

УДК 591.524.1(063)

ББК 28.0

Материалы Всероссийской конференции с международным участием
«ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ГИДРОБИОНТОВ» (Борок, 22-27 сентября 2012 г) изд-во, Борок, 2012. 400 с.

Сборник материалов опубликован при финансовой поддержке:
Отделения биологических наук РАН;
Российского фонда фундаментальных исследований (*проект № 12-04-06065 -з*);
ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет»

В книге представлены материалы Всероссийской конференции «Физиологические, биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов». Рассмотрен широкий круг теоретических и практических вопросов экологической физиологии, биохимии и молекулярной экологии, охватывающих проблемы адаптаций гидробионтов в онтогенезе и филогенезе; вопросы стабилизации внутренней жидкой среды организма, нейрогуморальной регуляции обменных процессов, адаптации пищеварительных процессов гидробионтов; а также устойчивости водных организмов и экосистем к действию биотических и абиотических факторов.

Ответственность за достоверность представленных к публикации материалов несут авторы.

Компьютерная верстка: Заботкина Е.А.

ISBN 978-5-91806-008-7

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

АДАПТАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ К ОБИТАНИЮ В ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ

Аксёнова О.В., Болотов И.Н., Беспалая Ю.В.

Институт экологических проблем Севера УрО РАН, г. Архангельск, Россия

e-mail: olgausa4eva@yandex.ru

Сообщества гидротерм представляют значительный интерес с точки зрения эволюции биосферы и, по мнению многих исследователей, являются аналогами сообществ, доминировавших на ранних этапах развития жизни на Земле (Заварзин, 1993).

Как правило, автотрофный компонент в биоте горячих источников представлен в основном синезелеными водорослями, синтезирующими органическое вещество при температурах до 90°C. Именно они развиваются в массовом количестве и создают трофическую базу для гетеротрофных организмов. Среди последних наиболее многочисленны простейшие, нематоды, олигохеты, коловратки, моллюски, ракообразные, насекомые и их личинки (Хмелева и др., 1985). Стабильность среды обитания в источниках позволяет называть их «природными лабораториями», на базе которых можно эффективно проводить различного рода исследования, корректно выявляя влияние на организмы того или иного фактора (Тахтеев и др., 2010).

В условиях проанализированных нами гидротерм Северной Евразии и Исландии чаще всего формируются специфические бентосные сообщества гастроподного типа (Болотов и др., 2012). Роль доминантов в них играют моллюски из семейства Lymnaeidae и в меньшей степени – из семейства Planorbidae. Остальные систематические группы, представленные в термальном бентосе, сравнительно немногочисленны и обычно не играют значимой роли в населении гидротерм. Среди них можно указать личинок хирономид, ручейников и других двукрылых, олигохет, нематод, амфипод, личинок и имаго жуков.

Несмотря на то, что гидротермальные сообщества располагаются в различных биогеографических регионах и, соответственно, различаются по генезису фауны и видовому составу, они практически идентичны по структуре и набору доминирующих форм. Поэтому их можно рассматривать в качестве аналогичных сообществ (Болотов и др., 2012). Известно, что основной причиной, приводящей к возникновению синэкологических аналогий, служит общность условий среды на каких-либо территориях. Видимо, гидротермальные системы, несмотря на кажущееся разнообразие их вариантов по температуре воды, ее гидрохимическому составу, гидрологическим и ландшафтным условиям, характеризуются некоей общностью экологических условий и предоставляют сходные возможности для их освоения живыми организмами.

В силу экстремальных градиентов ряда ведущих экологических факторов гидротермы резко ограничивают возможности для вселения в них гидробионтов. Среди этих факторов в первую очередь следует выделить высокую и константную по сезонам температуру воды, ее повышенную минерализацию, уровень кислотности и специфический газовый состав с очень низким содержанием кислорода.

Проанализировав состав фауны и структуру животного населения различных гидротерм (Болотов и др., 2012), становится очевидным, что наибольшего биологического прогресса в них достигают таксоны, формирование которых шло по пути приспособления к освоению экстремальных местообитаний. Поэтому фауну таких гидротермальных систем исходно следует рассматривать в качестве аллохтонной и миграционной, сформировавшейся из представителей различных таксонов, имеющих набор преадаптаций к освоению гидротерм, исходно приобретенных вне термальных аномалий. Например, личинки мух-журчалок рода *Eristalinus*, являются характерными представителями населения гидротерм (Лобкова и др., 2007), которые исходно адаптированы к заселению эвтрофных разлагающихся обводненных субстратов, зачастую характеризующихся анаэробными условиями. Легочные гастроподы – типичные обитатели прибрежной зоны и различных мелких постоянных и временных водоемов, где летом интенсивно развиваются водорослевые обрастания, а вода может прогреваться до очень высоких температур, отличается низким содержанием кислорода, повышенными концентрациями органических и нередко – минеральных веществ.

В условиях гидротерм у ряда групп беспозвоночных выработался комплекс физиолого-биохимических и поведенческих адаптаций, позволяющих им успешно обитать в условиях повышенных температур.

Биохимические адаптации. Молекулярные адаптивные механизмы включают синтез белков теплового шока (Hsp), позволяющие животным переносить повышенные температуры окружающей среды (Garbuz et al., 2008). Так, в горячих источниках о. Кунашир (температура 40°C) у личинок *Stratiomys japonica* (Stratiomyidae, Diptera) выявлены высокие концентрации белков теплового шока (Hsp70), благодаря которым они успешно осваивают экстремальные условия среды (Garbuz et al., 2008). Экспонирование амфипод при повышенных температурах вызывало усиление синтеза низкомолекулярных белков теплового шока у *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), *E. verrucosus* (Gerstf.), *E. vittatus* (Dyb.), *Gammarus lacustris* Sars., *G. tigrinus* (Sexton), *Chaetogammarus ischnus* (Stebbins) (Тимофеев и др., 2006).

Поведенческие адаптации. В горячих источниках Камчатки мухи-береговушки (Ephydriidae) откладывают яйца на естественные микровозвышения по руслу водотоков, во время излива горячие струи обтекают и мух, и яйца; в это время личинки находятся под бактериальным водорослевым матом, выползая на поверхность только в промежутках между изливами, когда температура среды понижается (Лобкова и др., 2007). Личинки мух львинок (Stratiomyidae) активно и быстро уползают из зоны действия высоких температур. В высокотемпературных водоемах они держатся по их периферии на мелководье, где температура не более 40°C.

Жизненные циклы. У некоторых гидробионтов в условиях гидротермальных местообитаний наблюдается значительное сокращение жизненного цикла особей. Так, длительность его у прудовика *Lymnaea hodutke* в камчатских гидротермах не превышает 70-80 суток (Хмелева и др., 1985), тогда как продолжительность жизненного цикла у моллюсков умеренной зоны составляет от одного года до нескольких лет. В то же время дефинитивные размеры *Lymnaea hodutke* значительно снижаются. Вместе с этим наблюдается более раннее наступление половой зрелости, круглогодичное размножение популяций, увеличение скорости воспроизводства и развития. Сходные адаптации к обитанию при повышенных температурах были установлены в лабораторных условиях для моллюсков *Physa acuta*, взятых в культуру из водоема, подогреваемого теплыми сточными водами электростанции Siekierki г. Варшава (Kamler, Mandecri, 1978). Сокращение размеров моллюсков в горячих источниках можно рассматривать как один из результатов реализации адаптивных стратегий видов. Аналогичные преадаптации наблюдались у *Gammarus lacustris*, населяющего термальные источники северной части Байкальского региона. Выявлено, что обитание в термальных источниках приводит к уменьшению размеров и снижению плодовитости рачков. Относительное постоянство температурного режима в горячих источниках вызывает также изменение сезонного репродуктивного ритма вида, а размножение приобретает круглогодичный характер (Тахтеев, 2009). Специфичность процессов размножения, а именно спаривания, была отмечена в популяциях Diptera и Ostracoda термальных источников Исландии (Mitchell, 1974). Способность к круглогодичному развитию отмечена у личинок мух-береговушек и львинок (Stratiomyidae), населяющих горячие источники Камчатки (Лобкова и др., 2007).

Исследования выполнены при поддержке грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых МД-4164.2011.5, РФФИ № 10-04-00897, 11-04-98817, УрО РАН № 12-П-5-1014, 12-М-45-2062, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» и проекта № 546152011 государственной ведомственной программы «Темплан вузов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотов И.Н., Беспалая Ю.В., Усачёва (Аксёнова) О.В. Экология и эволюция гидробионтов в горячих источниках Субарктики и Арктики: формирование аналогичных сообществ, адаптации видов и микроэволюционные процессы // Усп. современной биологии. 2012. Т. 132. № 1. С. 77–86.
2. Заварзин Г.А. Развитие микробных сообществ в истории Земли / Проблемы доантропогенной эволюции биосферы. М.: Наука, 1993. С. 212-222.

3. Лобкова Л.Е., Баринаева Е.С., Дулов Л.Е., Гальченко В.Ф. Взаимоотношения личинок мух *Eristalinus sepulchralis* с микроорганизмами в гидротермах кальдеры Узон (Камчатка) // Микробиология. 2007. Т. 76. №3. С. 405-415.
4. Тахтеев В.В. Амфиподы (Amphipoda) термальных и минеральных источников северной части Байкальского региона // Биота водоемов Байкальской рифтовой зоны. Изд-во Иркутского гос. ун-та. Иркутск. 2009. С. 123-130.
5. Тахтеев В.В., Галимзянова А.В., Амбросова Е.В., Кравцова Л.С., Рожкова Н.А., Окунева Г.Л., Семерной В.П., Помазкова Г.И., Лопатовская О.Г. Сообщества зообентоса и их сезонная динамика в незамерзающих источниках прибайкалья // Известия РАН. Серия Биологическая. 2010. № 6. С. 740.
6. Тимофеев М.А., Шатилина Ж.М., Бедулина Д.С., Протопопова М.В., Грабельных О.И., Побежимова Т.П., Колесниченко А.В. Стрессовые белки в механизмах стресс-адаптации Байкальских амфипод (Amphipoda, crustacea), сопоставление с палеарктическими видами // Journal of stress physiology and biochemistry. V. 2. №. 1. 2006. P. 41-49.
7. Хмелева Н. Н., Голубев А.П., Лаенко Т.М. Экология брюхоногих моллюсков из горячих источников Камчатки // Журнал общей биологии. Т. 46. № 2. 1985. С. 230-240.
8. Garbuz D.G., Zatssepina O.G, Przhiboro A.A., Yushenova I., Guzhova I.V., Evgen'ev M.B. Larvae of related Diptera species from thermally contrasting habitats exhibit continuous up-regulation of heat shock proteins and high thermotolerance // Molecular Ecology. № 17. 2008. P. 4763–4777.
9. Kamler E., Mandecri W. Ecological bioenergetics of *Physa acuta* (Gastropoda) in heated waters. Pol. Arch. Hydrobiol. 1978. V. 25. № 4. P. 833-851.
10. Mitchell R. The evolution of thermophily in hot springs. Quart. Rev. Biol. 1974. V. 49. № 3. P. 229-242.

ADAPTATION OF HYDROBIONTS TO HABITATION IN THERMAL SPRINGS

Aksenova O.V., Bolotov I.N., Bepalaya Yu.V.

Literature review and experimental data on the structure of hydrothermal communities in Northern Eurasia and Iceland shows that the greatest biological progress in hydrothermal systems reach the taxa, the formation of which went towards the development of adaptation to extreme environments. Therefore, the fauna of hydrothermal systems in the Arctic and Subarctic initially be regarded as allochthonous and migration, formed of representatives of different taxa, with a set of preadaptation to the development of fluid originally purchased outside the thermal anomalies. In various high-latitude thermal springs are formed similar benthic communities. Different populations of hydrobionts that inhabit hydrothermal vents, and developed a more entrenched range of physiological and biochemical adaptations that allow them to successfully live in conditions of high temperature.

ЭФФЕКТЫ РАУНДАПА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ МОЛОДИ РЫБ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ И pH

Аминов А.И., Голованова И.Л.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н

E-mail: golovan@ibiw.yaroslavl.ru

Хорошо известно, что продуктивность водоемов в значительной мере зависит от эффективности питания рыб, которая определяется не только количеством, но и качеством корма. Углеводы, несмотря на относительно низкое содержание в естественной пище большинства видов рыб, играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма. Об эффективности гидролиза углеводов можно судить по активности гликозидаз – ферментов, осуществляющих гидролиз ди- и полисахаридов.

Изучение действия факторов внешней среды на живые организмы, по-прежнему, остается одной из актуальных задач экологической физиологии. Наряду с важнейшими абиотическими факторами – температурой и pH, загрязняющие вещества, поступающие в водоемы, могут изменять активность пищеварительных ферментов и многочисленных лизосомальных гидролаз животных. Изучение характеристик указанных ферментов представляет значительный интерес не только для сравнительной, эволюционной и экологической физиологии, но также для

трофологии, поскольку они могут принимать участие в пищеварении у рыб и обеспечивать аутодеградацию собственных тканей (Голованова, 2011).

Температура является одним из основных абиотических факторов среды, определяющих основные параметры жизнедеятельности эктотермных животных. Изменение температуры среды приводит к значительным изменениям скорости основных метаболических процессов, темпа роста, интенсивности питания, скорости переваривания пищи и активности различных ферментов рыб (Алабастер, Ллойд, 1984; Уголев, Кузьмина, 1993).

Как правило, характеристики ферментных систем рыб достаточно хорошо адаптированы к температурным условиям среды обитания. Причем ферменты пойкилотермных животных способны функционировать при температуре, близкой к 0°C, когда ферменты теплокровных утрачивают активность (Уголев, Кузьмина, 1993). С увеличением температуры активность большинства ферментов возрастает, при этом происходит изменение ряда температурных и кинетических характеристик (t_{opt} , Q_{10} , E_{act} , V_{max} и K_m) пищеварительных гидролаз рыб. Наибольшей адаптационной пластичностью обладают ферменты, находящиеся в начале ферментативной цепи. Существует зависимость относительной активности ферментов в зоне низких температур от биологии вида. Так, активность α -амилазы у рыб, не питающихся в зимний период, при 0°C составляет 10-15%, у питающихся – 50–70% от максимальной активности (Уголев, Кузьмина, 1993).

Значения рН воды, в которой живут рыбы, варьирует в пределах от 3.5 до 10. Большинство видов рыб живет в воде с рН от 6 до 8, отдельные виды рыб - при экстремально низких значениях рН. В малых озерах с рН воды меньше 5 обитает только окунь (Комов, 1999). Значения рН в пищеварительном тракте рыб колеблются в широких пределах – от 1,6 до 10,5 (Сорвачев, 1982). У большинства видов рыб оптимальные значения рН пищеварительных гликозидаз отмечены в диапазоне 6–8 (Уголев, Кузьмина, 1993). Оптимум рН амилолитической активности, активности мальтазы и α -амилазы у пресноводных рыб находится в зоне 7,0–8,0, сахаразы у бентофагов – 7,0–8,0, у щуки – 6,0 (Кузьмина, 1986; Кузьмина, Неваленый, 1983).

Изменение температуры может влиять на рН-функцию ферментов. Так, в зоне оптимальных значений рН – 7.4 для “мирных” и рН 8.0 для хищных рыб, максимальный уровень активности кишечных гликозидаз отмечен при температуре 20°C, а низкие значения температуры снижают тормозящее действие кислых рН на активность α -амилазы, мальтазы и сахаразы в слизистой кишечника плотвы, щуки и леща (Уголев, Кузьмина, 1993). Таким образом, пищеварительные ферменты успешно функционируют в диапазоне температуры и рН, характерных для среды обитания и пищеварительного тракта рыб.

Среди антропогенных факторов, влияющих на функционирование водных экосистем, важная роль принадлежит ксенобиотикам, количество которых увеличивается с ростом уровня антропогенного загрязнения. Одним из них является высокотехнологичный системный гербицид глифосат, широко используемый в мире с середины 70-х годов прошлого века. На основе его действующего вещества изопропиламиновой соли глифосата создано много гербицидов, самый известный из которых Раундап. Это неспецифический гербицид широкого спектра действия, предназначенный для борьбы с однолетними и многолетними сорняками. За последние годы накопилось много сведений о токсичности Раундапа, а Европейский Союз признал глифосат, опасным для окружающей среды и токсичным для водных организмов. Тем не менее, он широко используется в Южной Америке, странах Восточной Европы для борьбы с зарастанием водохранилищ, прудов и каналов, а также в коллекторно-дренажных системах оросительного земледелия. При попадании гербицида в организм гидробионтов может изменяться активность пищеварительных ферментов и многочисленных лизосомальных гидролаз различных органов и тканей.

Цель данной работы состояла в изучении влияния гербицида Раундап на амилолитическую активность в слизистой оболочке кишечника и в целом организме молодых рыб при различных значениях рН и температуры.

В работе использована молодь 4 видов пресноводных рыб: тюлька *Clupeonella cultriventris* Nord., плотва *Rutilus rutilus* L., речной окунь *Perca fluviatilis* L., карп *Cyprinus carpio* L.

В суммарных гомогенатах целого организма или слизистой оболочки кишечника рыб определяли амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов,

гидролизующих крахмал - α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). Инкубацию гомогенатов и субстрата (растворимый крахмал в концентрации 18 г/л) проводили в течение 30 мин в 18 вариантах экспериментальных условий с использованием двух концентраций Раундапа (0 и 25 мг/л), трех значений температуры (0, 10 и 20°C) и трех pH (5,0, 7,4, 8,3). Выбор этих значений был обусловлен тем, что средняя сезонная температура для водоёмов умеренных широт России составляет 0–3° зимой, 10° весной и осенью, 20°C летом, а значения pH в пищеварительном тракте рыб в зависимости от стадии пищеварения варьируют от кислых до слабо щелочных значений (Сорвачев, 1982). Концентрация Раундапа 25 мкг/л выбрана как действующая на активность гликозидаз, исходя из результатов экспериментов, проведенных ранее (Голованова и др., 2011). За контроль принята ферментативная активность при температуре 20°C, pH 7,4 в отсутствие Раундапа (концентрация 0 мкг/л).

Данные по уровню амилолитической активности (АА) в слизистой оболочке кишечника рыб в присутствии Раундапа при различных значениях температуры и pH представлены на рис. 1. Значения АА в отсутствие Раундапа приняты за контроль (100%). При температуре 20°C и pH 7,4 тормозящий эффект Раундапа на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника карпа составил 20%, тюльки – 37% от контроля. У окуня достоверного тормозящего эффекта Раундапа не отмечено.

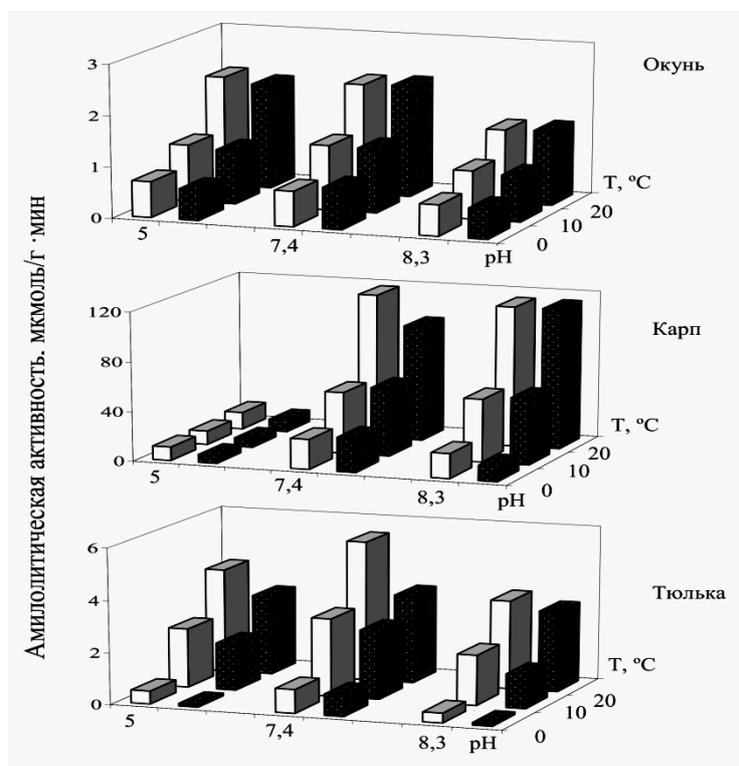


Рис. 1. Уровень амилолитической активности в слизистой оболочке кишечника рыб (окунь, карп, тюлька) при различных значениях температуры и pH.; □ – контроль, ■ – Раундап (25 мкг/л).

У карпа тормозящий эффект увеличивается в 1,5 – 2 раза в зоне кислых значений pH, особенно при низкой температуре. У окуня снижение pH не влияет на эффект Раундапа, у тюльки уменьшает его при 20°C и увеличивает при более низкой температуре. Снижение температуры при pH 7,4 нивелирует тормозящий эффект Раундапа у всех исследованных видов.

Максимальное снижение АА отмечено при комплексном действии температуры 0°C, pH 5 и в присутствии Раундапа: у окуня на 72% от контроля, карпа и тюльки на 95 и 98% соответственно. При этом, если у окуня эффект обусловлен в основном совместным действием температуры и pH, то у тюльки и карпа статистически достоверно усиление эффекта отмечено при действии трех факторов.

При температуре 20°C и рН 7.4 тормозящий эффект Раундапа на амилолитическую активность в целом организме молоди окуня составляет 16% от контроля, в то время как у плотвы отмечен стимулирующий эффект – увеличение на 11% (рис. 2). У молоди плотвы при рН 5 амилолитическая активность снижается на 24% от контроля, у окуня же снижение рН не влияет на величину эффекта. Снижение температуры от 20°C до 0°C у плотвы увеличивает стимулирующий эффект Раундапа на 55%, а у окуня практически не изменяет его. Наибольшее снижение АА отмечено при 0°C и рН 5 в присутствии Раундапа: на 97 и 54% у плотвы и окуня соответственно. Однако, этот эффект, главным образом, обусловлен совместным действием рН и температуры.

Ранее было показано, что амилолитическая активность в слизистой оболочке кишечника и целом организме молоди рыб при действии низкой температуры, кислых рН и Раундапа снижается в большей степени (на 80–98%, у беспозвоночных 29–88%). Меньшая чувствительность гликозидаз беспозвоночных животных к действию негативных факторов среды может быть обусловлена большей лабильностью адаптивных механизмов у более простых в эволюционном плане организмов или другим соотношением ферментов, гидролизующих углеводы.

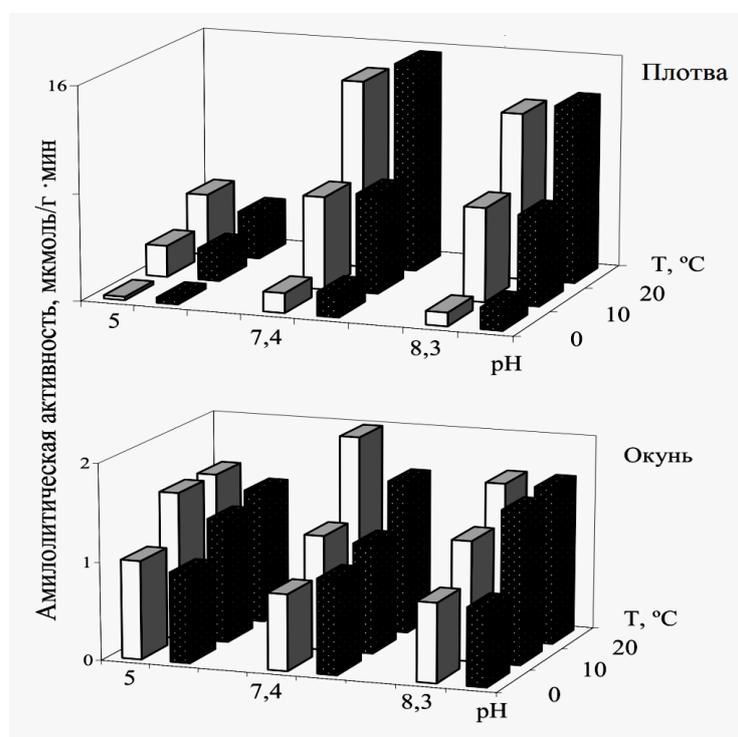


Рис. 2. Уровень амилолитической активности в целом организме рыб при различных значениях температуры и рН.; □ – контроль, ■ – Раундап (25 мкг/л).

В нашей работе установлено, что эффекты Раундапа варьируют при изменении температуры и рН. Снижение температуры в большинстве случаев уменьшает тормозящий эффект. В зоне кислых значений рН тормозящий эффект усиливается, особенно в кишечнике карпа. Совместное действие трех факторов в значительной степени снижает амилолитическую активность в слизистой оболочке кишечника и целом организме молоди рыб. Однако для большинства исследованных объектов вклад Раундапа в совместный эффект 3-х факторов незначителен по сравнению с совместным действием рН и температуры. Близкие результаты были получены и при щелочных значениях рН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алабастрер Д., Ллойд Р. Критерии качества воды для пресноводных рыб. М.: Легкая и пищ. Пром-сть. 1984. 344 с.

2. Голованова И.Л. Влияние абиотических факторов (температура, рН, тяжелые металлы) на активность гликозидаз у беспозвоночных животных // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2011. Т. 47. № 1. С. 15–19.
3. Голованова И.Л., Филиппов А.А., Аминов А.И. Влияние гербицида Раундап in vitro на активность карбогидраз молоди рыб // Токсикол. Вестник. 2011. № 5. С. 31–35.
4. Комов В.Т. Природное и антропогенное закисление малых озер северо-запада России: причины, последствия, прогноз. Автореф. дисс. ... док. биол. наук. С-Пб.: Ин-т озераведения РАН. 1999. 45 с.
5. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты). – М.: Лег. и пищ. промышленность. 1982. С. 247.
6. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. С.192–196.
7. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. Спб.: Гидрометеиздат, 1993. С. 238.

EFFECT OF HERBICIDE ROUNDUP ON ACTIVITIES OF GLYCOSIDASE JUVENILE FISH IN DIFFERENT VALUES OF TEMPERATURE AND PH

A.I. Aminov, I.L. Golovanova

Institute for Biology of Inland Waters, RAS, 152742 Borok, Russia

Was found the effects of Roundup vary with temperature and pH. Lowering the temperature in most cases reduces the inhibitory effect. The inhibitory effect is enhanced under acidic pH values, especially in the intestine of carp. The combined effect of three factors greatly reduces the amylolytic activity in the intestinal mucosa and the whole body of juvenile fish.

ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ КРОВИ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ ЖИДКОЙ СРЕДЫ ОРГАНИЗМА РЫБ

Андреева А.М.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п.Борок, Россия

E-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

Эволюция рыб охватывает несколько геологических эпох. Пережив глобальные изменения климата Земли, рыбы заняли господствующую позицию в Мировом океане, превзойдя по числу видов все другие группы позвоночных. Во многом такой успех обеспечен эффективными механизмами стабилизации внутренней жидкой среды организма, в состав которой входят белки плазмы крови.

Современные представления о белках плазмы и их транскапиллярном обмене у высших позвоночных основаны на модели крупных белков, состоящих из 1 полипептидной цепи, или как их называют, белков–мономеров, способных проникать через стенку капилляра в интерстициальное пространство в некоторых отделах капиллярной сети. Осмотическое взаимодействие крови рыб с водной средой обитания, уровень минерализации которой может существенно колебаться, требует наличия механизмов быстрой стабилизации водного обмена, что предполагает особенности как на уровне структуры белков крови, так и на уровне их транскапиллярного обмена. Пластический обмен пойкилотермных организмов зависит от температуры, что также предполагает участие транскапиллярного механизма в пластическом метаболизме белков крови, и, прежде всего альбумина. По этой причине организацию белков рыб следует рассматривать в тесной связи с микроциркуляторной системой. Распределение белков плазмы крови между внутри- и внесосудистым пространствами определяет баланс тканевой жидкости в организме, так как белки насасывают и удерживают воду, распределяя ее относительно стенки капилляра во внеклеточном пространстве таким образом, чтобы осмотические условия жидкой среды организма были комфортными для функционирования клеток.

На сегодняшний день накоплен обширный материал по белкам крови позвоночных. Белки рыб занимают особое положение ввиду высочайшего уровня структурного разнообразия. В наибольшей степени это относится к альбуминам, среди которых у рыб встречаются простые белки и гликопротеиды, мономеры и олигомеры с различными величинами мол. масс. В отличие от альбуминов организация глобулинов не претерпела в ходе эволюции позвоночных

существенных преобразований, вероятно, по причине узкой специфичности выполняемых глобулинами функций и направленности отбора на сохранение этих функций. Поэтому при анализе белков крови рыб из разных таксонов и биотопов наиболее высокое разнообразие выявлено именно в низкомолекулярной фракции.

Нами проведены комплексные исследования структурно-функциональной организации белков плазмы и их транскапиллярного обмена у рыб. Это позволило свести массив разнообразных форм организации белков плазмы рыб к нескольким дискретным типам и выделить основные принципы организации белков и белковых систем крови в эволюции *Pisces*. В данной работе представлены результаты анализа структурно-функционального разнообразия белков плазмы крови в разных таксонах и биотопах рыб и показана роль организации белков крови в стабилизации внутренней жидкой среды организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа структурной организации белков мы использовали методы ихтиологии и биохимии, а также MALDI-TOF-анализ. В качестве объектов использовали представителей хрящевых рыб, хрящевых ганоидов и костистых рыб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на принципиальное сходство в организации белков крови млекопитающих и рыб, последние имеют ряд существенных особенностей, которые затрагивают, в основном, низкомолекулярные фракции.

1. Особенности структурной организации белков крови *Pisces*. Несмотря на разнообразие белков плазмы крови у хрящевых и костных рыб, белки *Pisces* имеют общие принципы организации.

1.1. Наличие углевода в структуре белков. Не все белки крови млекопитающих являются гликопротеидами: углевод в структуре молекулы содержат только глобулины. У многих рыб гликопротеидами являются все белки крови - глобулины, альбумины (альбуминоподобные белки) и низкомолекулярные белки. Не обнаружены углеводы в структуре альбуминов у осетрообразных и лососевых рыб. Хотя в альбумине кумжи, в отличие от других лососевых, выявлены сиаловые кислоты (Metcalf et al., 1998). По прочности связи углевод-белок в гликопротеиде белки рыб и млекопитающих могут существенно различаться. Следствием гликозилирования белков рыб является 1) повышение уровня гетерогенности белков плазмы, 2) усложнение поверхностной структуры белков, 3) увеличение размера белковой молекулы, 4) усиление межмолекулярных взаимодействий белков, проявляющихся в их склонности к агрегированию, появлению белковых комплексов и олигомерных белков. В наибольшей степени эти черты проявились у белков пресноводных костистых рыб.

1.2. Множественность низкомолекулярных белков крови рыб. Множественность белков низкомолекулярных фракций наиболее выражена у хрящевых и костистых рыб. Их низкомолекулярные фракции содержат до 10 и более белков, в том числе и альбумины (альбуминоподобные белки). Резко отличаются от хрящевых и костистых осетрообразные рыбы. Их низкомолекулярные фракции представлены исключительно альбуминами, идентифицированными с помощью MALDI-TOF, множественность которых на электрофореграмме невысока и определяется количеством аллоформ, не превышающим у диплоидных видов трех, а у полиплоидных (русский, сибирский, амурский осетры) – шести.

1.3. Разные способы организации низкомолекулярных белков крови рыб. У хрящевых рыб низкомолекулярная фракция образована за счет олигомеризации или ковалентной модификации нескольких (1-2) низкомолекулярных белков; у осетрообразных рыб она представлена разными аллоформами альбумина; у костистых пресноводных рыб НМФ состоит из двух дискретных подфракций из негомологичных белков, согласованно перестраивающихся при изменениях пластического и водного обмена.

1.4. Усложнение структурной организации белков крови в эволюции *Pisces*. Сопоставимый уровень гетерогенности нативных белков крови на 2D-электрофореграмме (20-28 компонентов) у хрящевых и костных рыб, поддерживается разными способами организации этих белков в различных таксонах и биотопах рыб (Табл.1).

Табл.1. Количество нативных и денатурированных белков сыворотки крови рыб в 2D-электрофоретических системах*.

| Таксономическая группа рыб | Нативные условия | Денатурирующие условия | |
|--|--------------------------|------------------------|-----------|
| | | 8М мочевины | SDS |
| Хрящевые рыбы: <i>Акула</i> (1) | 28 | | 13 |
| | 20 | 10 | 17 |
| Хрящевые ганоиды: <i>Туводные</i> (1) | 24 | 26 | 46 |
| | <i>Полупроходные</i> (1) | 24 | 26 |
| | <i>Проходные</i> (2) | 28 | 25 |
| Костистые рыбы: <i>Морские</i> (18) | 26 | 17 | 43 |
| | <i>Пресноводные</i> (20) | 26 | 54 |

* В скобках указано количество видов рыб. (Андреева, 2010)

Так, разнообразие белков крови хрящевых рыб обеспечено небольшим числом субъединиц (13/17 субъединиц). У хрящевых ганоидов количество субъединиц в составе белков больше в три раза (46 субъединиц), а у пресноводных костистых рыб в 7,5 раз (98 субъединиц) по сравнению с катраном (13 субъединиц). Таким образом, наиболее сложно организованными оказались белки пресноводных *Teleostei*.

Прирост субъединиц обеспечивают состоящие из субъединиц белки - иммуноглобулины, гаптоглобины и олигомерный белок-альбумин: иммуноглобулины - в виде двух типов субъединиц (H- и L-цепи), гаптоглобины – также в виде двух типов субъединиц (альфа- и бэта-цепи), и олигомерный альбумин – в виде 10-13 субъединиц. Двукратное превышение количества субъединиц у пресноводных костистых рыб (98) по сравнению с морскими (43) обеспечивают, таким образом, в основном олигомерные белки-альбумины.

2. Влияние состава внеклеточной жидкости рыб на структурную организацию белков крови. Во внеклеточных жидкостях рыб основными осмотически активными компонентами являются соли, мочевины, ТМАО и белки (таблица 2).

Табл.2. Концентрации (г%) осмотически активных веществ в плазме хрящевых и костных рыб*.

| Рыбы | Соли | Мочевина | ТМАО | Белок |
|---|-----------|-----------|----------|---------|
| Морские хрящевые | 1.42-1.77 | 1.14-3.6 | 0.53-1.5 | 0.4-4.3 |
| Пресноводные хрящевые | | 0.49-0.78 | | |
| Осетрообразные (морские и пресноводные) | 1.7 | 0.02 | <0.53 | 2.8-6.5 |
| Костистые | 1.16-1.28 | 0.02-0.03 | 0.05 | 2.0-6.5 |

* использованы данные: Строганов, 1961; Шилов, 1985; Шмидт-Ниельсен, 1979; Anderson et al., 2002; Pillans Franklin, 2004; Speers-Roesch, Ballantyne, 2006; Villalobos, Renfro, 2007.

В разных таксонах рыб осмотичность внутренних жидкостей поддерживается разным содержанием и соотношением данных соединений. По отношению к морской воде внутренние жидкости хрящевых рыб оказались гипертоничны, а костных рыб – гипотоничны. Гипертоничность внутренних жидкостей хрящевых рыб поддерживается в основном за счет мочевины, а не за счет солей, которых у сельхий в два-три раза меньше, чем в морской воде. Внутренние жидкости осетрообразных и костистых рыб (как пресноводных, так морских и проходных) гипоосмотичны по отношению к морской воде. В их составе солей содержится примерно столько же, что и в жидкостях акул, а мочевины - почти в 100 раз меньше; вероятно, вследствие этого, содержание белка во внеклеточных жидкостях костных рыб превышает таковое у хрящевых в два-пять раз.

2.1. Влияние мочевины на структурную организацию белков крови рыб. Известно, что 2М NaCl вызывает диссоциацию олигомеров на мономеры. В жидкостях рыб содержание солей не превышает 1,77%, что соответствует 0.3М NaCl. Такая концентрация не вызывает диссоциацию олигомеров (Андреева, 1997). При концентрации мочевины 3г% (0.5М) диссоциация олигомеров уже происходит. Наблюдение за действием разных концентраций

мочевины (0-8М) на белки крови плотвы выявило диссоциацию олигомера при концентрации мочевины около 1М (Андреева, 2008). Организация белков хрящевых и костных рыб в условиях организма адаптирована к разным по составу внеклеточным жидкостям с разным содержанием мочевины:

- Белки исследованных хрящевых рыб в отсутствие мочевины представлены агрегированными формами; введение в реакционную среду мочевины приводит к диссоциации агрегатов на низкомолекулярные белки и снижению общего количества белков на электрофореграмме. При этом, все разнообразие нативных белков сформировано за счет небольшого числа субъединиц (2-3);
- У осетровых рыб под действием мочевины отмечено агрегирование альфа-1-глобулинов и одновременно - диссоциация олигомерных иммуноглобулинов;
- У некоторых морских *Teleostei* (треска, камбала) отмечены случаи агрегирования белков крови под действием мочевины;
- У пресноводных костистых рыб под действием мочевины олигомерные комплексы в области низкомолекулярной фракции распадаются на составляющие их белки (10-13).

Таким образом, сопоставимые концентрации солей и различные концентрации мочевины в составе плазмы крови формируют в разных таксонах разный облик белков крови: у хрящевых рыб высокие концентрации мочевины во внутренних жидкостях организма предотвращают агрегирование белков; у морских *Teleostei* незначительные количества мочевины в составе крови также поддерживают неагрегированную форму низкомолекулярных белков, а в крови пресноводных костистых рыб - именно агрегированную форму нескольких белков низкомолекулярной фракции, входящих в состав альбумина-олигомера. Разные стратегии в двух таксонах *Pisces* - на гипер- и гипоосмотичность внутренних жидкостей, а также разный состав этих жидкостей у хрящевых и костных морских и пресноводных рыб, определили свой особый способ организации белков в разных таксономических группах и биотопах рыб.

2.2. Влияние солености воды на организацию белков крови рыб. Изменение солености воды приводит к разным способам реорганизации низкомолекулярных фракций в разных таксономических группах костных рыб:

- У туводной пресноводной стерляди при адаптации к солености 20‰ в эксперименте происходит увеличение проницаемости стенок капилляров к альбуминам (Андреева, 2012); у проходных осетровых рыб смена морского периода на речной (и наоборот) приводит к изменению частот разных аллоформ альбумина (Кузьмин, 1996);
- У морского ерша распреснение морской воды в экспериментальных условиях приводит к перераспределению относительного содержания белков в низкомолекулярной фракции;
- У пресноводных костистых рыб под влиянием возрастающей солености происходят динамичные преобразования низкомолекулярной фракции в виде диссоциации олигомеров на мономерные белки и перераспределения пула низкомолекулярных белков между внутрисосудистым и внесосудистым пространствами. Именно эта способность белков крови пресноводных костистых рыб к динамичным перестройкам при изменениях солености воды выделяет пресноводных *Teleostei* из всех *Pisces*. Обнаружение этого механизма позволило считать фактор солености одним из формирующих структурное разнообразие альбуминов по типу мономер/олигомер.

3. Модели структурной организации белков крови рыб. Мы предлагаем несколько моделей белков крови рыб, в силу больших различий в их организации в разных таксонах и биотопах:

- у хрящевых рыб белки организованы по типу мономеров в среде, содержащей мочевину; в среде без мочевины белки представлены в виде агрегатов. Внутренняя жидкая среда организма хрящевых рыб содержит мочевину, поэтому белки в ней присутствуют в неагрегированной форме. В интерстициальное пространство белки плазмы крови фильтруются во всех отделах капиллярной сети;
- у хрящевых ганоидов белки организованы в виде мономеров, встречаются олигомерные иммуноглобулины. Белки плазмы крови фильтруются в тканевое пространство во всех отделах капиллярной сети, проницаемость стенок капилляров к разным белкам носит избирательный характер;

- у морских костистых рыб белки организованы по типу мономеров. Множественная низкомолекулярная фракция состоит преимущественно из мономерных белков, но встречаются виды (морской ерш) с олигомерным альбумином в составе этой фракции;
- у пресноводных костистых рыб белки представлены мономерами и олигомерами. Последние встречаются среди иммуноглобулинов и в низкомолекулярной фракции. Олигомерный альбумин на разных этапах пластического обмена имеет разный субъединичный состав. Выявлено два дискретных структурных типа олигомера, различающихся по количественному и качественному составу субъединиц. В ходе транскапиллярного обмена олигомерный альбумин может диссоциировать на составляющие его низкомолекулярные белки. Белки плазмы крови фильтруются в тканевое пространство во всех отделах капиллярной сети, проницаемость стенок капилляров к разным белкам носит избирательный характер. Олигомерные белки в составе низкомолекулярной фракции встречаются также у солоноватоводных и проходных костистых рыб. Другими словами, олигомеры обнаруживаются в крови только тех рыб, которые в жизненном цикле имеют (или имели) пресноводную фазу.

4. Сходство и различия белков рыб и млекопитающих на примере альбумина. В разных структурных моделях белков плазмы крови основные различия касаются организации низкомолекулярной фракции, в том числе и альбуминов. Слабая антигенная идентичность альбуминоподобных белков рыб из разных таксонов подтверждает серьезные различия их поверхностных свойств (Зорин и др., 1994) и первичных структур. Сравнение аминокислотных последовательностей альбуминов атлантического лосося *Salmo salar*, человека и др. млекопитающих не выявило общих мотивов (DB SwissProt BLAST); при трипсинолизе альбуминов рыб и млекопитающих образуются разные фрагменты (Abdreeva. 2012).

У некоторых рыб – осетрообразных и двоякодышащих - в структуре генов альбуминов обнаружены сходные с млекопитающими мотивы (Чихачев, 1982; Filosa et al., 1998; Danis et al., 2000; Metcalf et al., 2003, 2007): у австралийской двоякодышащей рыбы *Neoceratodus forsteri* обнаружен альбумин с высоким уровнем идентичности NH₂-терминального фрагмента (101 аминокислот) такому же фрагменту у млекопитающих. Сравнение клонированных альбуминовых cDNA целаканта и двоякодышащей рыбы с генами альбумина млекопитающих подтвердило их близкое родство (Metcalf et al., 2003, 2007). Идентичными альбумину млекопитающих оказались и большинство звеньев последовательности NH₂-концевого фрагмента альбумина белуги (цит. Чихачев, 1982).

Осетрообразные произошли от древних представителей *Paleonisci*, относящихся к лучеперым рыбам (*Actinopterygii*), а двоякодышащие и кистеперые - от рипидистий (*Rhipidistii*), которые дали начало первым тетраподам. Между тем, альбумины осетрообразных не похожи на альбумины костистых рыб, они похожи на альбумины млекопитающих и современных представителей двоякодышащих. Таков пример конвергентной эволюции белков у потомков рипидистий и палеонисков.

5. Принципы функциональной организации белков крови рыб. У многих пресноводных костистых рыб эритроциты имеют повышенную склонность к внутрисосудистому гемолизу, и гемоглобин, попав в кровь, крайне легко распадается на гем, глобин и Fe³⁺. При неблагоприятном сочетании факторов среды может происходить апоптоз ДНК эритроцитов, сопровождающийся разрушением гемоглобина и выбросом продуктов его деградации в кровотоки (Андреева и др., 2006). Адаптироваться и выжить в таких условиях костистым рыбам помогает оперативная система связывания продуктов деструкции гемоглобина не только специализированными белками трансферрином, гемопексином и гаптоглобином, но и всеми неспециализированными белками крови.

У хрящевых и туводных пресноводных осетрообразных рыб структурная устойчивость гемоглобинов невысока, но эритроциты достаточно прочные. Поэтому в кровотоке таких рыб нет свободного гемоглобина и продуктов его деструкции, а значит и нет необходимости в появлении дополнительных элементов системы связывания железосодержащих лигандов. У проходных осетрообразных прочными являются не только эритроциты, но и гемоглобин, который выдерживает двукратное замораживание, формируя после этой процедуры правильные кристаллы. Поэтому у хрящевых и осетрообразных рыб обнаружены лишь отдельные элементы такой системы в виде специализированных белков трансферрина и

гемопексина (у хрящевых рыб) или только трансферрина (у осетрообразных рыб); гаптоглобины в крови этих рыб не найдены.

Таким образом, в эволюции *Pisces* именно у *Teleostei* произошло, во-первых, увеличение числа специализированных белков, связывающих внутрисосудистый Hb и продукты его деструкции, и, во-вторых, снижение уровня специализации всех остальных белков крови, которые стали неспецифически связывать все Fe-содержащие лиганды. В наивысшей степени эта тенденция проявилась у олигомерного белка альбумина, который связывает и гемин, и Hb, и Fe³⁺, то есть является полифункциональным белком.

Выявлено два полярных типа функциональной организации белковых систем крови у рыб: дифференцированные системы из специализированных белков у хрящевых ганоидов, и дифференцированные системы из слабоспециализированных белков у пресноводных костистых рыб. Фактором, определившим снижение уровня специализации белков, являются особенности резистентных свойств эритроцитов и структурная неустойчивость гемоглобина. Снижение специализации белков пресноводных *Teleostei* обусловлено физиологической стратегией организма на предотвращение потерь железа.

6. Роль структурно-функциональной организации белков крови в стабилизации внутренней жидкой среды организма.

Выполнение белками плазмы крови возложенных на них функций осуществляется при непосредственном участии сосудов кровеносной системы; особенности стенок сосудов и структурная организация белков рыб «подогнаны» друг к другу:

1. В отличие от млекопитающих, у которых капилляры по проницаемости к белкам дифференцированы от 0 до высоких величин, у рыб капилляры разного типа абсолютно проницаемы ко всем белкам плазмы крови. Избирательный характер проницаемости капилляров рыб в отношении разных белков плазмы крови свидетельствует об участии в транскапиллярном обмене белков активных механизмов. Функциональная целесообразность такой избирательности заключается в адаптации метаболизма в разных тканях рыб к условиям среды и физиологическому состоянию организма.

2. Стабилизация внутренней жидкой среды организма достигается не только регуляцией проницаемости стенки капилляра, но и структурными преобразованиями белков, а именно - олигомерного альбумина, способного к диссоциации на составляющие его белки в ходе транскапиллярного обмена. Олигомерные альбумины обнаружены у семейств *Esocidae*, *Cyprinidae* и *Percidae* (пресноводные), *Clupeidae* (солонатоводные). Среди морских рыб олигомерный альбумин обнаружен у *Scorpaena porcus* L., однако, его участие в осморегуляции не выявлено (Андреева и др., в печ.). Механизм регуляции осмотического давления за счет обратимой диссоциации олигомеров характерен для внутриклеточных белков; для белков плазмы крови такой механизм является нетипичным (Шульц, Ширмер, 1982). Однако, такой механизм работает в экспериментальных условиях повышенной солености воды у пресноводных костистых рыб.

3. Стабилизации внутренней жидкой среды организма способствует и свойство всех белков плазмы крови к специфическому и неспецифическому связыванию Fe-содержащих лигандов, что предохраняет внутренние жидкости организма от «засорения» продуктами разрушения Hb.

PRINCIPLES OF ORGANIZATION OF BLOOD PROTEINS AND STABILIZATION OF THE INTERNAL ENVIRONMENT OF ORGANISM OF THE FISHES

Andreeva A.M.

Comprehensive studies of the structural-functional organization of the proteins of plasma and their trans-capillary exchange in fishes are carried out by the author. This made it possible to reduce the large mass of the most diverse forms of fish blood proteins organization to several discrete types and to single out the basic principles of the organization of proteins and protein systems of the blood in the evolution of *Pisces*. Work presents the results of the analysis of the structural-functional variety of blood proteins in different taxons and biotopes of fishes and the role of blood proteins organization in the stabilization of the internal environment of organism is shown.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ У РАЗЛИЧНЫХ ПО ЭКОЛОГИИ TELEOSTEI

Андреева А.М.* , Рябцева И.П.* , Ламаш Н.Е.**

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Россия

**Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

E-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

Одной из основных функций крови является транспорт необходимых для жизнедеятельности организма соединений к клеткам и тканям. С транспортной функцией крови тесно связана дыхательная функция. В ее обеспечении участвуют плазма и форменные элементы. В крови основным носителем дыхательной функции является белок гемоглобин, локализованный в эритроцитах; в других тканях ее выполняют другие белки из семейства глобинов (Weber, Vinogradov 2001; Burmester et al., 2002; Burmester, Hankeln, 2004; Freitas et al., 2004; Roesner et al., 2005).

Для функционирования гемоглобина, заключенного в эритроцит, важна целостность последнего. У всех позвоночных имеет место разнокачественность эритроцитов по резистентным характеристикам, которая формируется в результате действия на организм внешних и внутренних факторов. У человека в норме гемолиз эритроцитов начинает происходить в 0,46-0,42% растворе NaCl, полный гемолиз - в 0,32-0,3% NaCl. Снижение осмотической резистентности эритроцитов происходит вследствие изменений структурных и функциональных свойств мембран эритроцитов, происходящих при старении организма или под действием ряда факторов.

Эритроциты рыб по осмотической резистентности уступают млекопитающим: признаки гемолиза у них могут появляться уже при небольших разведениях физиологического раствора (0,9-0,81% NaCl), массовый гемолиз эритроцитов половозрелых рыб происходит, как правило, при 0,63-0,54% NaCl (Андреева, Рябцева, 2011). Резистентные характеристики эритроцитов рыб, как и человека, зависят от соотношения в эритроцитарном пуле молодых и зрелых форм; молодые эритроциты имеют повышенную осмотическую и кислотную резистентность по сравнению со старыми формами (Андреева, Рябцева, 2011). На резистентные показатели эритроцитов рыб влияет физиологическое состояние, старение, питание, липидный состав кормов, стрессы, pH, температура, токсиканты и др. факторы. Сезонные колебания процессов формирования эритроцитов рыб не вписываются в выраженные закономерности; в ряде случаев имеет место видоспецифичный характер показателей красной крови и их независимость от естественной динамики температуры воды (Солдатов, 2005).

Целью исследования является исследование сезонной изменчивости осмотической резистентности эритроцитов рыб и сравнительный анализ данного показателя у представителей пресноводных, морских, солоноватоводных и проходных *Teleostei*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов использовали *Teleostei*:

1) пресноводных - леща *Abramis brama* L. (30 экз.), карася серебряного *Carassius auratus* L. (15 экз.), плотву *Rutilus rutilus* L. (30 экз.), синца *Abramis ballerus* L. (20 экз.), густеру *Blicca bjoerkna* L. (5 экз.), чехонь *Pelecus cultratus* L. (5 экз.), уклейку *Alburnus alburnus* L. (10 экз.), щуку обыкновенную *Esox lucius* L. (13 экз.), судака обыкновенного *Stizostedion lucioperca* L. (10 экз.), отловленных в Рыбинском водохранилище; а также леща и плотву 0⁺-4⁺ (60 экз.), содержащихся в прудах;

2) морских - скорпену *Scorpena porcus* L., бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* P., бычка-мартовика *Mesogobius batrachocephalus* P., морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* L., зеленушку *Symphodus tinca* L., рыбу-звездочёта *Uranoscopus scaber*, султанку обыкновенную *Mullus barbatus* L. - из Черного моря (36 экз.);

3) солоноватоводных - тюльку черноморско-каспийскую *Clupeonella cultriventris* N., отловленную в Рыбинском водохранилище (10 экз.);

4) проходных - мелкочешуйную (*Tribolodon brandtii* D.) и крупночешуйную (*Tribolodon hakonensis* G) красноперок угай из Японского моря (13 экз.).

Кровь у рыб отбирали из хвостовых сосудов, для получения сыворотки кровь отстаивали, для получения плазмы кровь собирали в пробирки с 1%-ным раствором гепариноида. Отстоявшуюся эритроцитарную массу 3-кратно отмывали физ.раствором, центрифугировали и использовали в работе. Гемоглобин получали после отмывания эритроцитов в физ.растворе, последующего гемолиза в дист.воде и центрифугирования 10 мин при 2 тыс. об/мин. Для разрушения молодых эритроцитов, не гемолизирующих в дистилляте, использовали ультразвук (УЗДН-2Т, Россия). Hb регистрировали спектрофотометрически по наличию спектров и поглощению в области γ_1 -полосы Сорэ: окси-Hb поглощал при $\lambda_{\text{макс}}$ 411-414нм, мет-Hb – при $\lambda_{\text{макс}}$ около 406-408 нм.

Осмотическую резистентность эритроцитов изучали по их гемолизу в гипотонических растворах NaCl. Гемолиз проводили в течение 15 мин в растворах с разным разбавлением исходного 0,9%-ного NaCl (0,9%; 0,81; 0,72; 0,63; 0,54; 0,45; 0,36; 0,27; 0,18 и 0,09% NaCl) и в дист.воде, его эффективность оценивали по поглощению в области γ_1 -полосы Сорэ.

Для оценки физиологического состояния рыб анализировали мазки крови. Препараты окрашивали по Романовскому-Гимза при общем увеличении $\times 1400$. В каждой мазке анализировали не менее 500 клеток эритроидного ряда.

Электрофорез белков сыворотки, плазмы и Hb проводили в диск-электрофорезе. Для расчета отн.содержания внеклеточного Hb в крови образцы сыворотки (плазмы) разгоняли в диск-электрофорезе, окрашивали бензидином (для идентификации Hb) и Coomassie R-250 (окрашивание белка); окрашенные Coomassie гели денситометрировали. Рассчитывали отн.содержание Hb в каждой лунке. Результаты обрабатывали статистически. В небольших выборках ($n < 8$) рассчитывали $M \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка состояния крови у половозрелых рыб в процессе ее отбора и хранения в разные сезоны года (весенне-летний и осенний периоды).

1.1. Морские рыбы. При отстаивании (8°C) сыворотки крови исследуемых рыб (36 проб), отловленных в весенне-летний период, не было выявлено ни одного случая гемолиза эритроцитов, за исключением 1 пробы с кровью зеленушки.

1.2. Пресноводные рыбы. В весенне-летний период сыворотка и плазма крови синца, леща, уклеи и густеры были, в основном, гемолизированы; у леща встречались негемолизированные образцы крови. У синца и леща отн.содержание внеклеточного Hb в сыворотке варьировало от 0,02 до 50% и выше. У плотвы и чехони гемолиз эритроцитов также имел место, но не носил перманентного характера. В осенне-зимний период наряду с гемолизированными мы получали и негемолизированные образцы сыворотки и плазмы данных видов. В сыворотке крови щуки внеклеточный Hb отсутствовал, за исключением единичного случая. У судака в летний период встречались гемолизированные образцы плазмы и сыворотки.

При хранении негемолизированных образцов сыворотки над ступком крови при 8°C гемолиз эритроцитов у рыб происходил в разные сроки: у леща, как правило, в течение суток; у плотвы спустя сутки; у судака через 2-3 суток; у щуки через 2-6 суток с начала отстаивания сыворотки; следы гемолиза эритроцитов появлялись через 2-3 суток и в сыворотке серебряного карася. Эти показатели сохранялись для рыб, отловленных как в летний, так и в осенний период.

В период подготовки к нересту у щуки, леща и плотвы, имеющих гонады 4 стадии зрелости, были отобраны сыворотка и плазма крови. Эритроциты всех рыб оказались в высокой степени устойчивыми к гемолизу: в сыворотке и плазме над осадком эритроцитов следы гемолиза не появлялись в течение 7 дней (Рис.1).

1.3. Тюлька. Плазма тюльки над осадком эритроцитов оставалась негемолизированной неделю при температуре хранения 8°C , после чего гемолиз эритроцитов произошел одновременно во всех 10 пробах.

1.4. Красноперка. Плазма красноперки, отловленной в октябре, отстаивалась после отбора крови при 8°C без следов гемолиза; следы гемолиза эритроцитов появились в плазме через 4 дня после отбора крови. У рыб, отловленных в мае, начавшая отстаиваться плазма также не имела следов гемолиза. Майские пробы крови с гепарином хранились три дня при 8°C и один день (4-й по счету после отбора крови) при более высокой температуре в связи с трудностями доставки проб в лабораторию; на 4-й день после отбора крови в узкой полоске плазмы,

примыкающей к осадку форменных элементов, были замечены следы гемолиза во всех 13 образцах.

Таким образом, негемолизированные образцы плазмы и сыворотки крови надежно удавалось получить только у морских рыб (весенне-летний период), тюльки (сентябрь) и красноперки (май, октябрь), что характеризует их эритроциты как относительно устойчивые. У пресноводных костистых рыб выявлена широкая вариабельность по этому показателю – от видов с перманентным гемолизом эритроцитов (синец, лещ) до видов с устойчивыми эритроцитами (щука); весенне-летние образцы крови отличались меньшей устойчивостью эритроцитов к гемолизу.

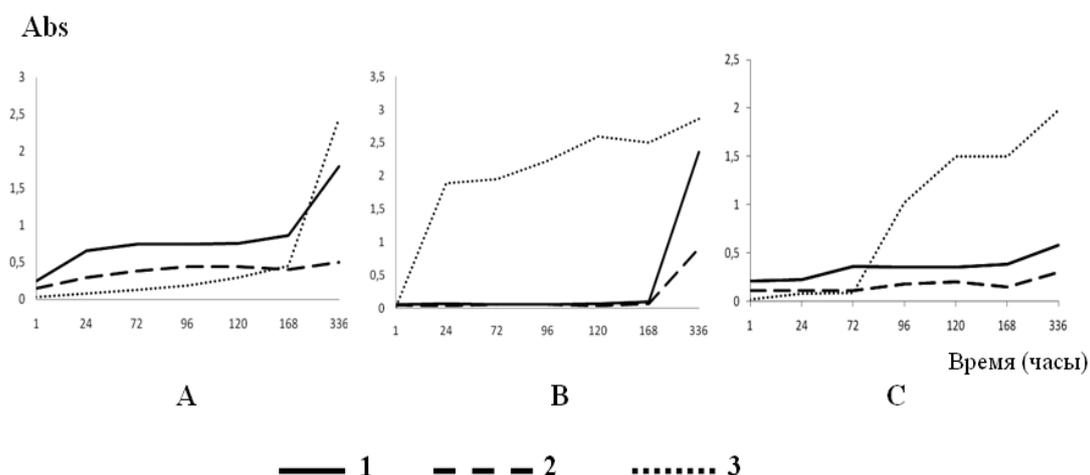


Рис. 1. Динамика гемолиза эритроцитов при отстаивании сыворотки (1) и плазмы (2) над осадком эритроцитов и в физиологическом растворе (3) при температуре 8⁰С у плотвы (А), леща (В) и щуки (С) в преднерестовый период. По оси абсцисс – время в часах, по оси ординат – поглощение в области Сорэ (Abs). Пояснения в тексте.

2. Особенности осмотической резистентности эритроцитов у рыб в весенне-летний и осенний периоды.

2.1. Морские рыбы. Практически у всех морских видов, отловленных в весенне-летний период, удалось сохранить в негемолизированном виде эритроциты в процессе их отмывания. В физ.растворе наиболее устойчивыми оказались эритроциты скорпены, практически не гемолизирующие в течение 15 минут эксперимента. У других видов (морского налима, султанки, звездочета, бычка-мартовика и бычка-кругляка) через 15 минут в физ.растворе эритроциты гемолизировали в той или иной степени.

У султанки, бычка-мартовика и налима выявлена дифференциация эритроцитов по осмотической резистентности. Так, у морского налима обнаружено три фракции эритроцитов: 1) первыми в диапазоне 0,9-0,72% NaCl гемолизировали эритроциты с мет-гемоглобином ($\lambda_{\text{макс}} = 408$ нм); 2) вторыми в диапазоне 0,72-0,0% NaCl - эритроциты с мет- и окси- гемоглобином ($\lambda_{\text{макс}} = 410$ нм); 3) третью фракцию составили молодые эритроциты, не гемолизирующие даже в дистиллированной воде. На подсушенном зафиксированном спиртом неокрашенном мазке эти эритроциты под микроскопом выглядели как круглые клетки эритроидного ряда. У бычка-мартовика старые, зрелые и молодые формы эритроцитов также гемолизировали дифференцированно: 1) первая менее устойчивая фракция - при 0,9-0,64%NaCl (406 нм), 2) вторая в диапазоне 0,56-0,27% NaCl (408-410 нм) и 3) третья в диапазоне 0,18-0,0% NaCl (412 нм). У скорпены, звездочета и бычка-кругляка Hb из разных фракций эритроцитов был только в окси-форме (412-414 нм).

2.2. Пресноводные рыбы. Эритроциты большинства исследованных пресноводных видов, отловленных в разные сезоны, гемолизировали или имели следы гемолиза в физиологическом растворе в первые 15 минут. Так, гемолиз эритроцитов леща и плотвы в физиологическом растворе при 8⁰С происходил перманентно, о чем свидетельствует непрерывное нарастание абсорбции в области Сорэ. При этом, эритроциты леща начинали гемолизировать сразу после отбора крови, у плотвы гемолиз эритроцитов наступал, как правило, через сутки, у щуки через

6 суток. У щук, имеющих гонады 4-й стадии зрелости, в преднерестовый период эритроциты гемолизировали через 3 суток, у леща и плотвы – в течение суток (Рис.1).

У щук, отловленных летом, эритроциты начинали гемолизировать в 0,9-0,81%-ном растворе NaCl, массовый гемолиз происходил в 0,5%-ном NaCl. У щук, отловленных осенью, эритроциты начинали гемолизировать в 0,72%-ном NaCl, массовый гемолиз также происходил в 0,5%-ном NaCl. У щук, отловленных летом, при гемолизе всех эритроцитов выделялся только окси-гемоглобин, а у осенних щук первыми в диапазоне 0,9-0,81% NaCl гемолизировали эритроциты с мет-гемоглобином (406 нм), далее в диапазоне 0,72-0,45% NaCl – эритроциты с мет- и окси-гемоглобином (408-410 нм), и последними в диапазоне 0,27-0,0% NaCl – эритроциты с окси-гемоглобином (414 нм) (Рис.2).

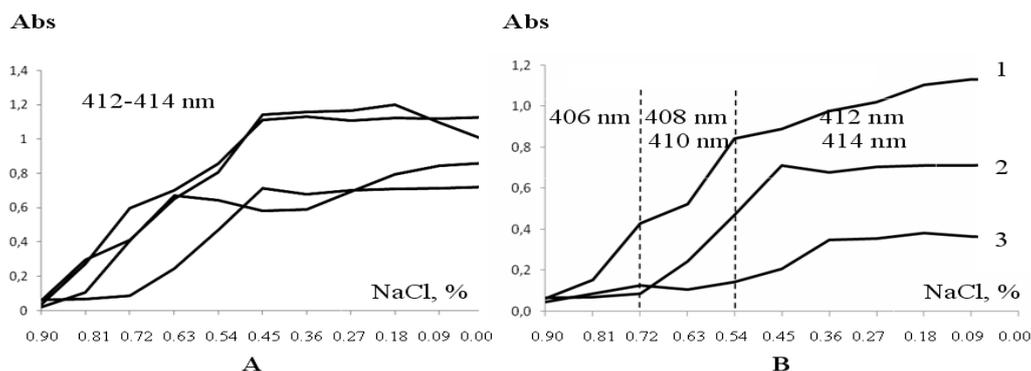


Рис. 2. Кривые осмотической резистентности эритроцитов щуки в летний период (неполовозрелые щуки, А) и осенний период (В): самка 3 (1); половозрелая щука, стадия не определена (2), сеголеток (3). По оси абсцисс – концентрация NaCl в %, по оси ординат – поглощение в области Сорэ (ABS). Вертикальные пунктиры разделяют эритроциты на фракции, содержащие мет-(406 нм, 408 нм) и окси- (412 нм) гемоглобины.

У половозрелой плотвы из водохранилища в весенне-летний период массовый гемолиз эритроцитов происходил в 0,45%-ном NaCl, у леща и синца - был размыт в диапазоне 0,72-0,27% NaCl. У леща и плотвы из прудов (возраста 3+ и 4+) в весенний и осенний периоды эритроциты различались по осмотической резистентности: гемолиз эритроцитов осенних рыб начинался в 0,63-0,54%-ном NaCl, а весной - в 0,72%-ном NaCl. Показатели резистентности эритроцитов осенних рыб из Рыбинского водохранилища совпадали с таковыми для рыб из прудов.

Весной и летом Hb из гемолизированных молодых и зрелых эритроцитов половозрелых синца, леща и плотвы был только в окси-форме, при этом, только у синца молодые эритроциты не гемолизировали даже в дистиллированной воде. Осмотическая резистентность молодых эритроцитов синца варьировала по сезонам: у летнего синца молодые эритроциты не гемолизировали, а у осенних синцов молодые эритроциты гемолизировали и в слабых растворах NaCl, и в воде.

Наиболее устойчивыми к гемолизу оказались эритроциты сеголетков и годовичков (лещ, плотва): они начинали гемолизировать в 0,27% NaCl, двухлеток – в 0,36% NaCl. На третьем году жизни осмотическая резистентность эритроцитов достигала минимальных дефинитивных показателей.

2.3. Тюлька. У тюльки обнаружено несколько фракций эритроцитов, различающихся по устойчивости к гемолизу: неустойчивая фракция, содержащая мет-гемоглобин, начинала гемолизировать в 0,72%-ном NaCl, более устойчивая фракция, содержащая окси-гемоглобин, гемолизировала в 0,45%-ном NaCl.

2.4. Красноперка. Эритроциты красноперок, отловленных в мае, были дифференцированы по устойчивости к гемолизу: менее устойчивая фракция гемолизировала в диапазоне 0,81-0,63% NaCl, более устойчивая – в 0,63-0,36% NaCl, обе фракции высвобождали только окси-Hb (412-414 нм) (Рис.3).

В октябре у красноперки первая фракция эритроцитов гемолизировала в диапазоне 0,9-0,63% NaCl, освобождая мет-Hb, вторая в 0,63-0,36% NaCl с мет- и окси-Hb, третья в 0,36-0,0% NaCl с

окси-Нб. Молодые эритроциты не гемолизировали в дист. воде, содержали окси-Нб. Эритроциты крупно- и мелкочешуйной красноперок по показателям резистентности не различались.

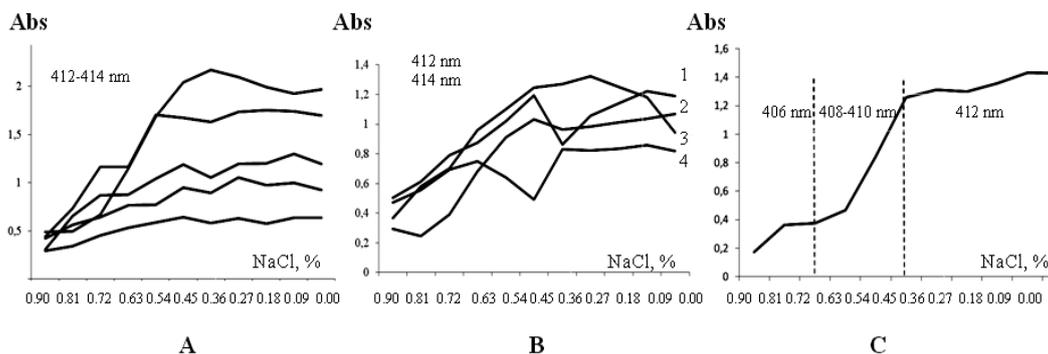


Рис.3. Осмотическая резистентность эритроцитов красноперки в мае (А, В) и октябре (С) у самок (А) и самцов: ♂II (С); ♂IV (1, 2) (В); ♂III (3) (В); ♂отнерестившихся (4) (В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования выявлены некоторые закономерности:

1) снижение солености водной среды обитания рыб, в целом, коррелирует со снижением устойчивости эритроцитов рыб к гемолизу;

2) выявлена более широкая вариабельность резистентности эритроцитов у пресноводных рыб по сравнению с морскими; различия эритроцитов пресноводных рыб коррелировали с разными экологическими условиями: у активных и хищных видов эритроциты были прочнее, чем у менее подвижных и не хищных;

3) эритроциты рыб в весенне-летний период отличались меньшей устойчивостью к внутрисосудистому гемолизу по сравнению с осенним периодом;

4) наиболее высокие показатели резистентности эритроцитов отмечены у пресноводных рыб с гонадами 4-й стадии зрелости;

5) в онтогенезе 0^+ - 4^+ и старше леща и плотвы максимальные показатели осм. резистентности эритроцитов в гипотонических растворах NaCl выявлены у сеголетков и годовичков; не выявлено у них и ни одного случая внутрисосудистого гемолиза;

6) в весенне-летний период у молоди и половозрелых пресноводных и морских рыб и красноперки выявлено по несколько фракций эритроцитов, различающихся по осм. резистентности; все они содержали окси-Нб. Осенью у пресноводных рыб и красноперки различные по резистентности фракции эритроцитов содержали мет- и окси-Нб;

7) молодые и зрелые эритроциты всех рыб различались по устойчивости к гемолизу: старые, содержащие мет-Нб, гемолизировали в первую очередь; молодые, содержащие окси-Нб, были устойчивыми в гипотоничных растворах NaCl. Молодые эритроциты, содержащие окси-Нб, формировали несколько фракций: одни гемолизировали при больших разведениях физ.раствора, другие не гемолизировали в дистиллированной воде.

Выявленные закономерности позволяют сделать предположение о доминирующей роли солености среды, образа жизни, питания, репродуктивной фазы и стадии онтогенеза в формировании дифференциации эритроцитов рыб по осмотической резистентности.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам Института биологии южных морей НАН Украины Рудневой Ирине Ивановне и Шайде Валентину Григорьевичу за предоставленные образцы крови морских видов рыб.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00954-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева А.М., Рябцева И.П. 2011. Механизмы адаптаций дыхательной функции крови у Teleostei // *Вопр. ихтиологии*. Т. 51. № 6. С. 834-843.
2. Солдатов А.А. 2005. Особенности организации и функционирования системы красной крови рыб // *Журнал эвол. биохимии и физиол.* Т.41. №3. С.217-224.

3. Burmester T., Ebner B., Weich B., Hankeln T. 2002. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues // *Mol. Biol. Evol.* Vol.19. P.416–421.
4. Burmester T., Hankeln T. 2004. Neuroglobin: A respiratory protein of the nervous system // *News Physiol. Sci.* Vol.19. P.110–113.
5. Freitas T. A., Hou S., Dioum E. M., Saito J. A., Newhouse J., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., Alam M. 2004. Ancestral hemoglobins in Archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 101. P.6675–6680.
6. Roesner A., Fuchs C., Hankeln T., Burmester T. A. 2005. Globin Gene of Ancient Evolutionary Origin in Lower Vertebrates: Evidence for Two Distinct Globin Families in Animals // *Molecular Biology and Evolution.* Vol.22. №1. P.12-20.
7. Weber R. E., Vinogradov S. N. 2001. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations // *Physiol. Rev.* Vol.81. P.569–628.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE OSMOTIC RESISTANCE OF ERYTHROCYTES OF TELEOSTEI DIFFERENTED IN THE ECOLOGY

A.M. Andreeva, I.P. Ryabtseva, N.E. Lamash

The authors investigated the seasonal variability of the osmotic resistance of erythrocytes in representatives of fresh-water, sea, saltish-water and migratory *Teleostei*. The regularities, which make it possible to make an assumption about the dominant role of the salinity of medium, the means of life, nourishment, reproductive phase and stage of ontogenesis in the formation of the differentiation of fishes erythrocytes on the osmotic resistance are revealed.

АДАПТАЦИИ ТРАНСКАПИЛЛЯРНОГО ОБМЕНА БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ К ФАКТОРАМ ВНУТРЕННЕЙ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПРЭСНОВОДНЫХ *OSTEICHTHYES*

Андреева А.М., Федоров Р.А.

Институт биологии внутренних вод им.И.Д.Папанина РАН, Борок, Россия
e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

Транскапиллярный обмен белков плазмы крови представляет собой динамичный процесс обмена белками и их распределения между внутрисосудистым и внесосудистым компартментами. Значимость этого процесса в поддержании общего гомеостаза организма определяется его исключительной ролью в поддержании баланса внеклеточной жидкости.

Теоретические основы динамики обмена внеклеточной жидкости в организме были изложены Старлингом (Starling, 1895) в его гипотезе о природе капиллярного обмена, согласно которой назначение белков плазмы состоит в удержании воды внутри сосудов. Допущение гипотезы заключалось в том, что фильтроваться через стенку капилляра в интерстициальное пространство белки плазмы не могут. Современные исследования доказали наличие транскапиллярного перемещения интраваскулярных белков плазмы в интерстициальное пространство у млекопитающих и других позвоночных. Учитывая основополагающее значение фильтрации внеклеточной жидкости для поддержания всех функций организма и ключевую роль белков в ее обеспечении, необходимость изучения становления транскапиллярного обмена белков крови в эволюции позвоночных является очевидной. В связи с этим закономерен интерес к особенностям распределения белков плазмы в различных внеклеточных жидкостях у низших представителей позвоночных – Рыб. Исследования в этой области затрагивают разные аспекты проблемы транскапиллярного обмена белков плазмы крови рыб (Hargens et al., 1974; Чихачев, Цветненко, 1979; Kiernan, Contestabile, 1980; Omura et al., 1985; Чалов, 1986; Duff, Olson, 1989; Olson et al., 2003; Phillips, 2003; Jeong et al., 2008). Целью данной работы является комплексный анализ 1) фракционного состава белков плазмы крови и тканевых жидкостей; 2) проницаемости стенок капилляров в разных участках капиллярной сети; 3) проницаемости стенки капилляра для разных групп белков крови и 4) адаптации этих параметров транскапиллярного обмена к некоторым факторам внутренней и внешней среды у пресноводных *Teleostei*. Для сравнения использовали кровь и тканевые жидкости морских *Teleostei*, а также представителей *Chondrostei* и *Chondrichthyes* рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов использовали пресноводных *Teleostei*: леща *Abramis brama*, плотву *Rutilus rutilus*, карася серебряного *Carassius auratus*, карпа обыкновенного *Cyprinus carpio*, линя *Tinca tinca*, щуку обыкновенную *Esox lucius*, окуня *Perca fluviatilis*, отловленных в Рыбинском водохранилище; пресноводных *Chondrostei* – стерлядь *Acipenser ruthenus* L., подрошенную в прудах. Для сравнения использовали - морских *Teleostei*: морского ерша (скорпену) *Scorpaena porcus* L., бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* P., бычка-мартовика *Mesogobius batrachocephalus* P., морского карася ласкиря *Diplodus annularis* L., а также морских *Chondrichthyes* – скатов морского кота *Dasyatis pastinaca* L. и лисицу *Raja clavata* L., отловленных в Черном море.

Кроме половозрелых рыб использовали лещей 2+, полученных в результате естественного нереста производителей в нерестовом пруде экспериментального хозяйства Сунога ИБВВ РАН. Лещей 2+ помещали в аквариумы и содержали без пищи в течение нескольких месяцев. Кровь отбирали из хвостовых сосудов рыб, в работе использовали сыворотку СК и плазму крови ПК. Аналог интерстициальной жидкости – тканевую жидкость ТЖ (перитонеальная ПЖ, мозга ТЖМ, белых мышц ТЖБМ) отбирали с помощью пипеток или напityванием полоской хроматографической бумаги Watmann 3ММ. Концентрацию общего белка в крови и тканевой жидкости определяли микробиуретовым методом, отдельных белков и фракций – с помощью программного пакета OneDscan. Белки дифференцировали в градиенте концентраций ПААГ (5-40%), в ПААГ с 8М мочевиной и в SDS-ПААГ. Для определения ММ нативных белков использовали в качестве маркеров полимерные формы ЧСА и ОА, в SDS-ПААГ - набор PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). Результаты обрабатывали статистически с помощью ПП Exel, Statistica и OneDscan.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ фракционного состава белков в плазме крови и в тканевых жидкостях рыб. Все тканевые жидкости рыб содержали белки. Причем, белковый состав всех внеклеточных жидкостей совпадал. Это свидетельствует о том, что тканевые жидкости являются фильтратами плазмы.

Электрофоретический анализ белков крови и тканевых жидкостей (мозга, брюшины, белых мышц) в неденатурирующих условиях выявил особенности их фракционного состава: в большинстве случаев тканевые жидкости костистых рыб содержали характерную низкомолекулярную фракцию, присутствовавшую в следовых количествах и в плазме; тканевые жидкости хрящевых рыб (2 вида скатов) не имели такой фракции (Рис.1А). У разных видов костистых рыб в составе низкомолекулярной фракции количество белков различалось, максимальное число белков (10-12) выявлено в тканевых жидкостях карася (серебряного и морского) и карпа.

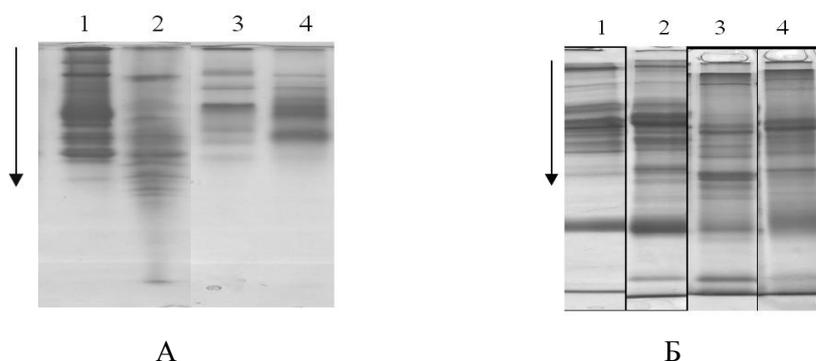


Рис. 1. А - электрофорез в градиенте концентраций ПААГ сыворотки (1, 3) и перитонеальной жидкости (2, 4) ласкиря (1, 2) и морского кота (3, 4), Б – SDS-электрофорез белков плазмы (1), тканевой жидкости мозга (2), мышц (3) и брюшины (4) бычка-кругляка.

Анализ белков внеклеточных жидкостей рыб в денатурирующих условиях электрофореза (в ПААГ с мочевиной, в SDS-ПААГ) выявил идентичность фракционного состава белков плазмы крови и тканевых жидкостей (Рис.1Б). MALDI-TOF-анализ подтвердил их идентичность (Рис.2).

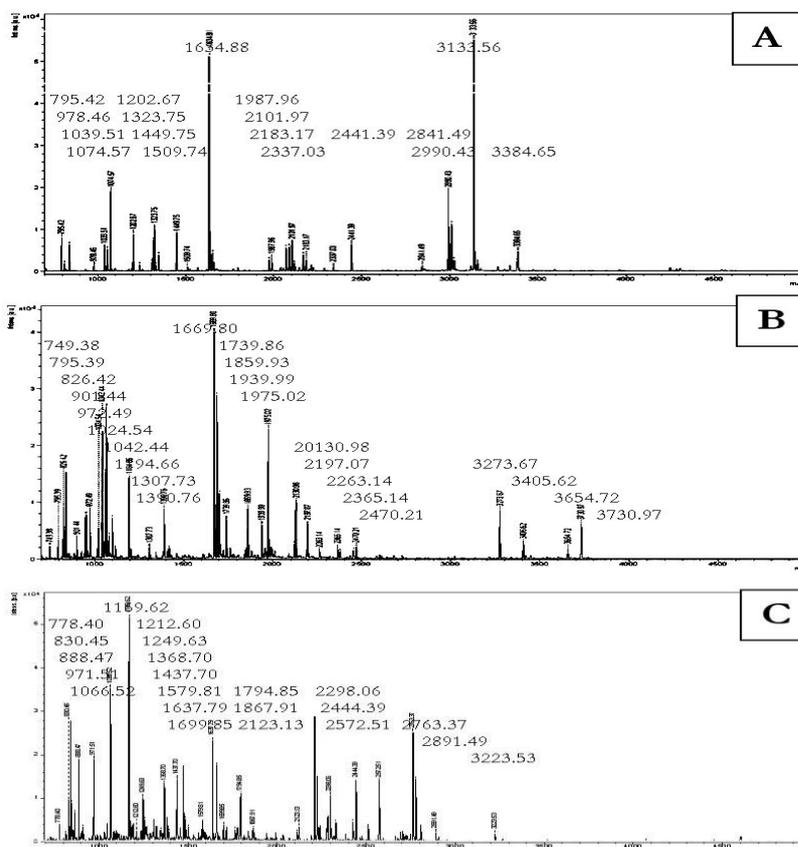


Рис. 2. Масс-спектры альбуминоподобного белка (А), трансферрина (В) и IGH (С) из внеклеточных жидкостей организма плотвы (плазма крови, перитонеальная жидкость). По оси абсцисс – величины молекулярных масс продуктов трипсинолиза белков (Да), по оси ординат – величина сигнала продуктов трипсинолиза белков. Цифры означают величины ММ продуктов трипсинолиза исследуемых белков.

Относительное содержание отдельных белков в тканевых жидкостях и плазме крови различалось у всех рыб (Рис.3). Это свидетельствует о наличии активных механизмов, поддерживающих градиент концентраций между интраваскулярными и интерстициальными белками.

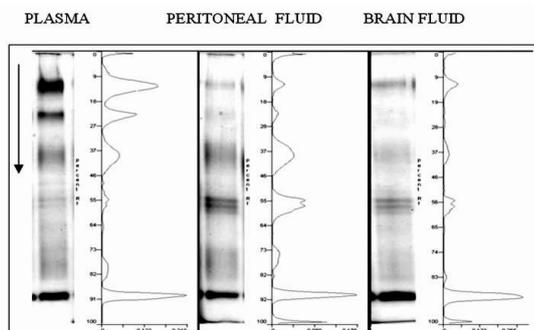


Рис. 3. Электрофореграммы и денситограммы белков плазмы крови, перитонеальной жидкости и тканевой жидкости мозга стерляди. Вертикальная стрелка указывает направление электрофореза в градиенте концентраций ПААГ.

2. Избирательная проницаемость стенок капилляров разного типа для белков плазмы крови рыб. Для оценки свойств стенки капилляра, фильтрующей интраваскулярные белки плазмы, мы использовали коэффициент фильтрации (τ), равный отношению концентраций белков в плазме крови и интерстициальной жидкости. Значения коэффициента фильтрации белков в разных участках капиллярной сети у разных рыб представлены в Таблице 1. Различия коэффициента фильтрации белков в разных участках капиллярной сети свидетельствует о наличии гетерогенности капилляров по свойству пропускания интраваскулярных белков в интерстициальную жидкость.

Таблица 1. Коэффициенты фильтрации белков плазмы крови в разных участках капиллярной сети (брюшины, мозга, белых мышц) некоторых видов рыб

| Вид рыб | Брюшина | Мозг | Белые мышцы |
|-------------------|---------|------|-------------|
| Лещ | | 0.05 | 0.78 |
| Плотва | 0.78 | 1.42 | |
| Серебряный карась | 1.35 | 0.83 | |
| Карп | 0.76 | 0.6 | 0.35 |
| Щука | 0.85 | 0.63 | |
| Морской ерш | 0.55 | 0.73 | |
| Бычок-мартовик | 0.35 | 0.54 | |

3. Избирательная проницаемость стенок капилляров для различных белков крови рыб. Анализ коэффициентов фильтрации отдельных белков плазмы крови выявил значительную вариабельность этого показателя. Причем, зависимости эффективности фильтрации белков от величины молекулярной массы не обнаружено: не все низкомолекулярные белки фильтровались с легкостью, а высокомолекулярные малоэффективно (Рис.4).

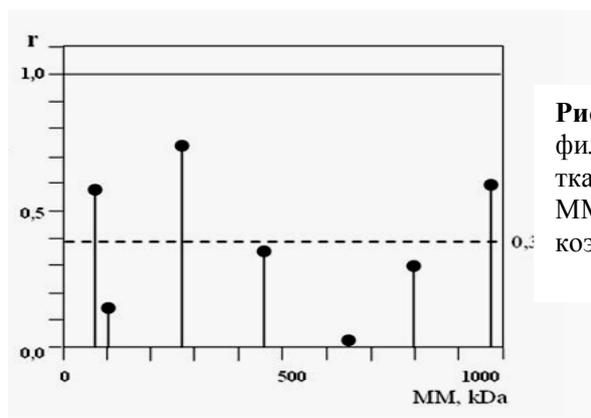


Рис. 4. Определение коэффициентов фильтрации белков плазмы крови стерляди в тканевую жидкость мозга. По оси абсцисс - MM белков в kDa, по оси ординат - коэффициенты фильтрации белков τ .

4. Зависимость показателей транскапиллярного обмена белков плазмы в условиях действия внутренних и внешних факторов (голодание, заболевание, изменение солености).

4.1. Избирательность фильтрации альбумина при голодании рыб. В опытах по адаптации серебряного карася к голоданию отмечено снижение общего белка в плазме почти в 2 раза по сравнению с питающимися рыбами. Однако, относительное содержание пластического белка альбумина оставалось в крови голодных рыб на постоянном уровне ($16,0 \pm 1,9$), а в тканевой жидкости мышц возрастало с $5,41 \pm 0,35$ до $7,9 \pm 1,33$. Такой прирост содержания альбуминов в тканевой жидкости голодных рыб при общем снижении белка в плазме обусловлен, вероятно, приоритетами транспортной функции альбумина, транспортирующего необходимый для нейромышечного возбуждения Ca^{2+} и жирные кислоты, за счет окисления которых клетки получают энергию. Кроме того, в отсутствие экзогенных источников пищи сами альбумины могут использоваться как пластическое сырье (Morgan, 1969; Mouridsen, 1969).

4.2. Избирательность фильтрации иммуноглобулинов в условиях аэромоноза. При заражении карпов *Aeromonas hydrophila* выявлен рост относительного содержания

иммуноглобулинов в сыворотке и жидкости брюшины на третьи сутки; на 7-и и 14-е сутки содержание Ig в сыворотке снижалось до контрольных величин, а в тканевой жидкости в 8-10 раз превысило показатели в норме (Рис.5).

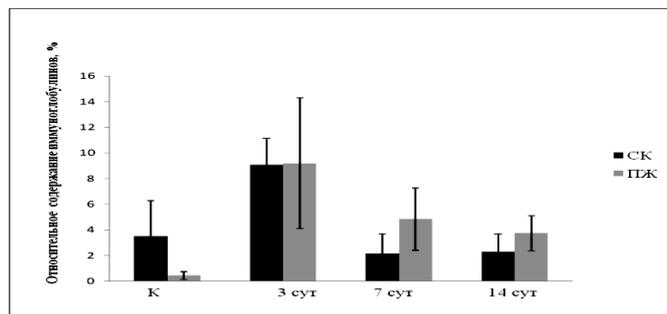


Рис. 5. Относительное содержание Ig в сыворотке крови СК (темная заливка) и перитонеальной жидкости ПЖ (светлая заливка) у карпов, не иммунизированных *Aeromonas hydrophila* (К – контроль) и иммунизированных *A. hydrophila*. Время экспозиции иммунизированных рыб - 3, 7 и 14 суток.

4.3. Влияние солёности на фильтрацию белков плазмы у леща. Адаптации леща и плотвы к условиям повышенной солёности приводили к перераспределению низкомолекулярных белков (70 кДа и ниже) относительно стенки капилляра. При адаптации лещей 2+ к солёности 8 и 10‰ относительное содержание НМБ в плазме не менялось (12.05 ± 1.15 в пресной воде, 10.95 ± 1.15 при 8 ‰, 13.55 ± 0.25 при 10‰), а в тканевой жидкости мышц наблюдался значительный прирост отн. содержания НМБ (от 28.10 ± 0.50 в пресной воде до 33.67 ± 3.10 и 36.45 ± 1.95 при 8 и 10‰ соответственно). Таким образом, увеличение солёности воды приводило к достоверному нарастанию относительного содержания низкомолекулярных белков в тканевой жидкости рыб. У морского вида - скорпены - распреснение воды не приводило к достоверным изменениям отн. содержания НМБ в тканевой жидкости. Отн. содержание НМБ в плазме скорпены было ниже, чем в тканевых жидкостях; содержание скорпены в морской и распреснённой воде, в целом, не изменило этой тенденции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, тканевые жидкости рыб являются фильтратами плазмы крови. Содержание белка в них, в целом, ниже, чем в плазме крови. Различия в содержании отдельных белков по обе стенки капилляра поддерживают активные механизмы, которые определяют избирательный характер фильтрации белков плазмы крови.

Функциональная целесообразность изменения параметров фильтрации белков через стенку капилляра в условиях действия внутренних и внешних факторов проявляется в адаптации фильтрации отдельных белков: в условиях солёности - для осмотически активного альбумина, при заболеваниях - для иммуноглобулинов, в условиях голода - для низкомолекулярных белков плазмы крови.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биологии южных морей НАН Украины Рудневой Ирине Ивановне и Шайде Валентину Григорьевичу за предоставленные образцы крови морских видов рыб.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 10-04-00954-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Starling, EH. 1895. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J. Physiol. (London)*, 19, 312-326.
2. Hargens, AR; Millard, RW; Johansen, K. High capillary permeability in fishes. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.*, 1974 48(4), 675-80.
3. Чихачев А.С., Цветненко Ю.Б. 1979. Исследование белков крови азовских осетровых при их искусственном воспроизводстве. Труды ВНИИ морского рыб. хозяйства и океанографии. 133. С.104-121.
4. Kiernan, JA; Contestabile, A. 1980. Vascular permeability associated with axonal regeneration in the optic system of the goldfish. *Acta Neuropathol.*, 51(1), 39-45.
5. Omura, Y; Korf, HW; Oksche, A. 1985. Vascular permeability (problem of the blood-brain barrier) in the pineal organ of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 239(3), 599-610.
6. Чалов Ю.П. 1986. Изобретение «Устройство и способ взятия проб интерстициальной жидкости у рыб».

7. Duff, Olson, 1989; Duff, DW; Olson, KR. Response of rainbow trout to constant-pressure and constant-volume hemorrhage. *Am J Physiol.*, 1989 257(2), 1307-14.
8. Olson, KR; Kinney, DW; Dombrowski, RA; Duff, DW. 2003. Transvascular and intravascular fluid transport in the rainbow trout: revisiting Starling's forces, the secondary circulation and interstitial compliance. *J Exp Biol.*, 206(3), 457-67.
9. Phillips, K. 2003. Trout with tone. *J.Exp.Biol.*, 206, 424-426.
10. Jeong, JY; Kwon, HB; Ahn, JC; Kang, D; Kwon, SH; Park, JA; Kim, KW. 2008. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull.*, 75(5), 619-28.

ADAPTATIONS OF THE TRANS-CAPILLARY EXCHANGE OF BLOOD PROTEINS TO THE FACTORS OF INTERNAL AND ENVIRONMENT IN REPRESENTATIVES OF FRESH-WATER *OSTEICHTHYES*

A.M. Andreeva, R.A. Fedorov

The analysis of the fractional composition of proteins from serum and tissue fluids, of permeability of capillaries walls for the different groups of proteins, of adaptations of the parameters of the trans-capillary exchange of proteins to some factors of the environment of fishes is executed by the authors of work. It is shown that the tissue fluids of fishes are the filtrates of blood plasma. The content of protein in them, as a whole, is lower than in the plasma. Differences in the content of separate proteins on both walls of capillary are supported by the active mechanisms, which determine the selective nature of the filtration of the proteins of the plasma. The functional expediency of changing of filtration parameters under the conditions of acting of internal and external factors is manifested in the adaptation of the filtration of the separate proteins: under the conditions of salinity - for osmotically active albumin, with the diseases - for the immunoglobulins, under the conditions of hunger - for the low-molecular plasma proteins.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА *ANADARA INAEQUALVIS BRUGUIERE* В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНОКСИИ И ГОЛОДАНИЯ

Андреевко Т.И.

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

Исследования механизмов адаптации гидробионтов к действию биотических и абиотических факторов актуальная проблема экологической физиологии и биохимии водных организмов.

Аноксия и голодание, наиболее часто встречаемые в природе состояния, с которыми приходится сталкиваться моллюскам. В обоих случаях организм имеет ограниченный резерв энергетических и пластических субстратов, от которого, в конечном итоге, зависит продолжительность выживания в экстремальных условиях.

Следует отметить, что в естественных условиях для моллюсков-фильтраторов голодание не может быть полным, а только частичным в связи с недополучением тех или иных питательных субстратов. Однако информация о влиянии голодания на обменные процессы в тканях данной систематической группы организмов крайне ограничена. Установлено снижение уровня глюкозы и гликогена в гемолимфе (Carefoot et al., 1992), уменьшение частоты сердечных сокращений (Santini et al., 2002) и дыхания (Albentosa et al., 2007). Возможна ли адаптивная реорганизация метаболизма у данной группы организмов в условиях полного голодания - неизвестно.

Цель настоящей работы - изучить направленность реорганизации белкового метаболизма в тканях двустворчатого моллюска *Anadara inaequalvis* в ответ на изменение биотических (обеспеченность пищей) и абиотических (уровень содержания кислорода в среде) факторов среды его обитания.

В работе использовали особей *Anadara inaequalvis* (далее анадара) с длиной раковины 30-33 мм. Моллюсков собирали с коллекторных установок рыбодобывающего предприятия "Дон-Комп" (бухта Стрелецкая, Севастополь). Транспортировку животных осуществляли в контейнере насыпью без воды в течение 1 часа от момента сбора. Перед проведением

исследований моллюсков выдерживали в аквариумах с проточной морской водой в течение 2-3 суток для снятия состояния стресса.

Для моделирования внешней аноксии использовали специально изготовленный стенд. Он позволял поддерживать заданную температуру и концентрацию кислорода в воде в течение неограниченного промежутка времени. Содержание кислорода в воде снижали в течение 2,5–3,0 ч с 8,5–8,7 до 0 мг л⁻¹ прокачиванием N₂. Контроль за величиной PO₂ осуществляли потенциометрически. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5221 (Польша). Экспозиция составляла 3 суток. Контрольная группа моллюсков содержалась в аналогичных условиях при концентрации кислорода в воде 8,5–8,7 мг л⁻¹ (95–97 % насыщения).

Для моделирования состояния голода морскую воду для эксперимента доставляли из 10-ти мильной зоны и подвергали термической обработке при 80-85°C в течение 4-х часов. После этого ее пропускали через мембранный фильтр (Synproг – 2,5) под вакуумом. Экспериментальная часть работы выполнена на специально разработанном стенде. Он 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 за концентрацией кислорода в воде осуществляли потенциометрически. В течение опыта она не снижалась ниже 7 мг л⁻¹. В работе применяли оксиметр ELWRO N 5123 (Польша). Экспозиция – 18 суток. Пробы тканей отбирали на 1-е, 6-е и 18-е сутки эксперимента.

При проведении экспериментов в обоих случаях температуру воды поддерживали на уровне 20±1°C. Фотопериод составлял 12 часов день: 12 часов ночь. Ежедневно производили полную смену воды в емкостях для удаления метаболитов.

Препарирование тканей проводили при температуре 0-4°C. 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°C.

В тканях моллюсков оценивали активности аланин - и аспартатаминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) динитрофенилгидрозиновым методом (Камышников, 2004), активность γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) – по реакции с L- γ -глутамил-п-нитроанилидом, а катепсина D – по кислоторастворимым продуктам ферментативного гидролиза гемоглобина (Камышников, 2004). Все измерения выполняли при 25,0±0,5°C. Одновременно определяли содержание в тканях белка по методу Лоури (Lowry, 1951), аминного азота по реакции с нингидрином и мочевины по реакции с диацетилмонооксимом (Меньшиков, 1987). В работе использовали стандартные наборы реактивов: «Simco, Ltd» (при определении активностей АлАТ и АсАТ), ООО НПП «Филисит диагностика» (при определении активности γ -ГТП) и «Lachema» (при определении содержания мочевины).

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 1.25). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения судили по сопоставлению абсолютных величин средней арифметической и моды.

Как показали результаты настоящих исследований, голодание моллюсков приводило к увеличению содержания белка в тканях ноги и гепатопанкреаса, а в жабрах, наоборот, – к снижению (рис 1).

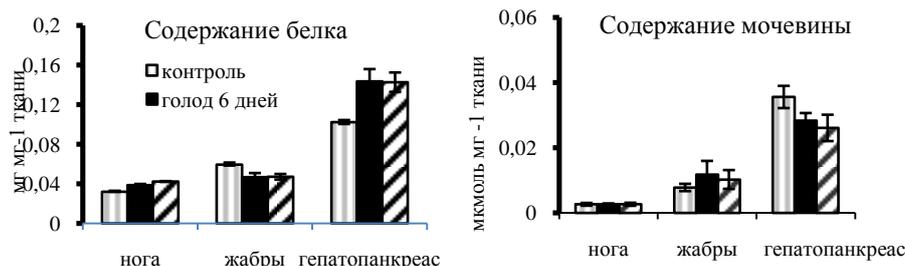


Рис. 1. Содержание белка и мочевины в тканях моллюсков в условиях голодания

Это происходило на фоне подавления активности γ -ГТП и уменьшения уровня свободных аминокислот во всех исследуемых тканях (рис. 2).

Изменения активностей ферментов АсАТ и АлАТ в условиях голодания было неоднозначно: в гепатопанкреасе наблюдался рост активности АсАТ, в ноге - активности АлАТ, в жабрах изменения активностей ферментов выявлено не было.

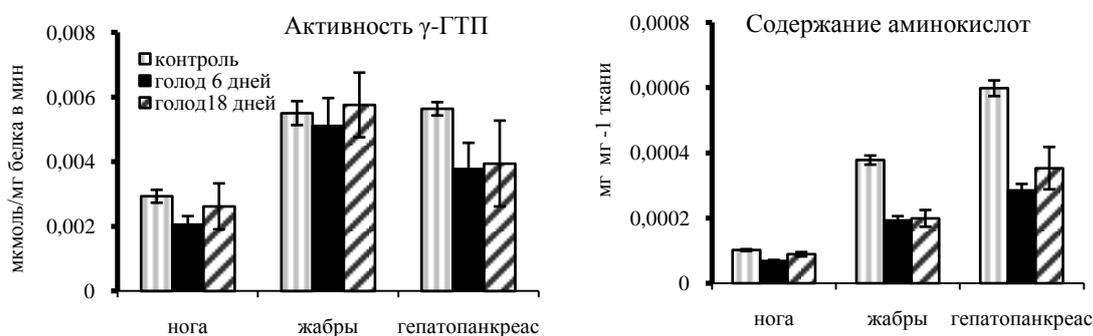


Рис. 2. Активность γ -ГТП и содержание аминокислот в тканях моллюсков в условиях голодания

Необходимо отметить, что увеличение белковых ресурсов в тканях гидробионтов на начальных этапах голодания отмечают и другие авторы (Frolov, Pankov, 1992; Qian, 2002). 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).

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 содержание мочевины в тканях не изменялось, а в некоторых случаях уменьшалось (гепатопанкреас). Это означает, что снижение тканевого пула аминокислот не было связано с процессами дезаминирования. Донором аминокислот, вероятно, выступает гепатопанкреас, так как только в этом органе отмечался существенный рост активности катепсина D (рис 3).

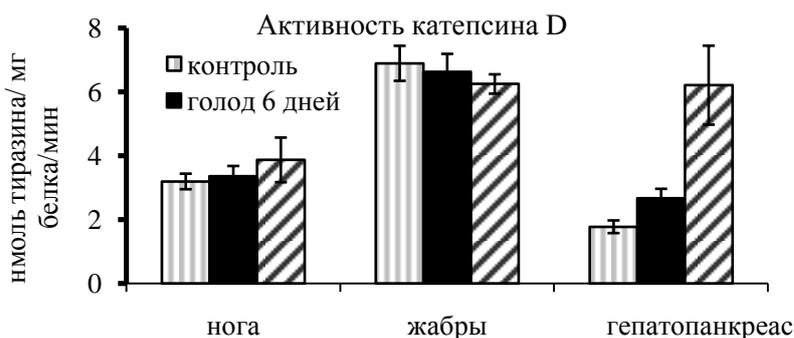


Рис. 3 – Активность катепсина D в тканях моллюсков в условиях голодания

Аноксия, в отличие от голодания, вызвала уменьшение содержания белка во всех исследованных тканях моллюска на 15-30 % ($p < 0,05$) (табл.1). Пул свободных аминокислот при этом повышался на 35-50 % ($p < 0,01$). В ноге и жабрах анадары отмечали значительный рост содержания мочевины 45-100 % ($p < 0,05$). Это позволяет констатировать усиление процессов белкового катаболизма в тканях моллюска в условиях внешней аноксии.

Активность катепсина D в условиях настоящего эксперимента либо не изменялась (нога), либо претерпевала существенное понижение (жабры, гепатопанкреас). Это происходило на фоне роста активности γ -ГТП на 35-70 % ($p < 0,05$). Из чего следует, что в тканях анадары при внешней аноксии гидролизу подвергаются не цельные белки, а олигопептиды с которыми взаимодействует γ -ГТП, освобождая глутамат используемый в сукцинаттиокиназной реакции.

О ее реализации в тканях анадары свидетельствовал рост активности АлАТ на 30-60 % ($p < 0,05$) в ноге и жабрах моллюска (табл. 1). Это позволяет получать дополнительный ресурс макроэргов и исключает накопление токсичного лактата.

Таблица 1. Содержание белка, аминокислот, мочевины и активности ферментов АлАТ, АсАТ и γ -ГТП в тканях анадары в условиях нормоксии (норма) и аноксии

| Показатели | Виды тканей | | | | | |
|---|---------------------------|------------|-------------|------------|----------------|------------|
| | нога | | жабры | | гепатопанкреас | |
| | норма | аноксия | норма | аноксия | норма | аноксия |
| Белок, мкг·мг ⁻¹ ткани | 38,7±1,2 | 28,4±2,4 | 46,9±4,0 | 35,9±3,0 | 143,5±12,5 | 116,4±3,9 |
| Аминокты, нг·мг ⁻¹ ткани | 68,5±3,1·10 ⁻³ | 92,7±5,0 | 192,6±13,3 | 282,3±11,5 | 285,1±19,5 | 423,8±37,9 |
| Мочевина, нм·мг ⁻¹ ткани | 2,68±0,24 | 3,85±0,3 | 11,8±4,2 | 25,0±2,5 | 28,4±2,3 | 15,7±3,5 |
| АлАТ, мкмоль·мг ⁻¹ белка мин ⁻¹ | 0,28±0,01 | 0,38±0,03 | 0,18±0,02 | 0,29±0,01 | 0,19±0,007 | 0,13±0,003 |
| АсАТ, мкмоль·мг ⁻¹ белка мин ⁻¹ | 0,09±0,007 | 0,12±0,008 | 0,096±0,009 | 0,14±0,009 | 0,1±0,007 | 0,07±0,009 |
| γ -ГТП, нмоль·мг ⁻¹ белка мин ⁻¹ | 2,0±0,2 | 2,0±0,1 | 5,0±0,8 | 8,0±0,4 | 3,0±0,8 | 6,0±0,1 |

Примечание: объемы выборочных совокупностей – 10 особей

Таким образом, следует отметить, что направленность процессов реорганизации тканевого метаболизма в условиях аноксии и голодания не совпадала. Так, процесс адаптации анадары к голоданию идет по пути использования резерва аминокислот в процессах биосинтеза белка. Это отражает уменьшение уровня аминного азота во всех исследованных тканях и рост содержания белка при отсутствии выраженных изменений концентрации мочевины в органах моллюска. Аноксия, наоборот, усиливает процессы белкового катаболизма, приводящие к снижению содержания белка, росту уровня свободных аминокислот и мочевины.

Кроме того, процессы, стоящие за реорганизацией белкового метаболизма в условиях аноксии и голодания, не совпадают во временном масштабе. В условиях аноксии они были зарегистрированы в течение первых 3-суток от начала эксперимента, а при голодании отмечались только на 18-е сутки.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что депривация пищи вызывает у моллюсков принципиально иную реорганизацию белкового метаболизма в тканях, чем в условиях внешней аноксии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Carefoot T.H. et al. Effect of starvation on blood-glucose and tissue-glycogen levels in the northern abalone *Haliotis kamtschatkana* // Journal of Shellfish Research. 1992. Vol. 11, № 2. P. 551–558.
- 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. Vol.256, № 1. P. 11–15.
- Albentosa M., Fernández-Reiriz M.J., Labarta U., Pérez-Camacho A. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: physiological and biochemical parameters // Comp. Biochem. Physiol. 2007. Vol. 146, №2. P. 241–249.
- Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 501 с.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 266. P. 75.
- Меньшиков В.В. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: [Справочник] М.: Медицина, 1987. 365 с.
- 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.

8. 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. Vol. 9, № 2. P.133–137.
9. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. М.: Наука, 1981. 278 с.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE REORGANIZATION OF PROTEIN METABOLISM IN TISSUES OF THE MOLLUSK *ANADARA INAEQUIVALVIS* UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ANOXIA AND STARVATIONS

T.I. Andreenko

It has been found that under experimental anoxia conditions the processes of protein catabolism are intensified in gills and digestive gland of mollusk. The low molecular peptides are predominantly hydrolyzed. The process of adaptation of anadara to starvation involves using the amino acids reserves for protein biosynthesis. Hepatopancreas seems to be a donor of amino acid. Starvation causes in molluscs essentially other reorganisation of a protein metabolism in tissues, than in the conditions of an experimental anoxia.

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК *LÉMNA MINOR L.* В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РЕЧКИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Андрусишин Т. В., Грубинко В. В.

Тернопольський національний педагогічний університет ім. В. Гнатюка,

ул. М. Кривоноса 2, Тернополь, Україна

E-mail: tan.soroka2010@yandex.ua

Водные растения в силу особенностей среды обитания, подвергаются постоянному воздействию различных экстремальных факторов, среди которых особое место занимают антропогенные. В последнее время значительно ухудшились физико-химические показатели водоемов, что вызывает стресс-адаптационные реакции в организме гидробионтов.

К числу наиболее опасных химических загрязнителей относятся тяжелые металлы (ТМ). Их избыточное поступление в водоемы часто приводит к необратимым изменениям и нарушениям жизненно важных функций у большинства растений (Растение и стресс, 2008). Несмотря на то что многие тяжелые металлы не являются необходимыми для растений, они могут ими активно поглощаться, накапливаются и длительное время находятся в клетках организма (Титов, 2007). Соединения тяжелых металлов влияют на ростовые процессы, размножение водных растений и т.п. При этом, отдельные металлы в определенных концентрациях являются необходимыми для процессов жизнедеятельности, а другие – токсичные.

Характерными для водных растений адаптивными реакциями на негативное влияние факторов внешней среды, включительно действие ионов тяжелых металлов, являются структурные изменения на клеточном уровне. В первую очередь, эти изменения касаются клеточных мембран, поскольку биологические мембраны представляют собой специальные полупроницаемые барьеры, отделяющие внутриклеточное содержимое и содержимое внутриклеточных органелл от окружающей среды (Брагина, 2002). Ранее в лабораторных экспериментах установлено, что адаптация клеток водных растений к загрязнителям (тяжелые металлы, дизельное топливо) сопровождается специфическим процессом – формированием системы вторичных концентрических мембран как структурно-функциональная защита клеток на токсическое воздействие (Грубинко, 2011).

Целью настоящего исследования было подтверждение выявленных эффектов у водных растений, произрастающих в условиях загрязненного тяжелыми металлами естественного водоема (реки).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали процесс мембранообразования в клетках ряски малой *Lémna minor L.*, которую отбирали из естественного водоема (р. Збруч, Хмельницкая обл., Украина) на протяжении вегетационного сезона. Основными факторами экологического неблагополучия в этой речке являются: флуктуации рН воды, дефицит растворенного кислорода, седиментация

растворенных органических веществ. Речка также характеризуется превышением фоновых показателей содержания в воде свинца, кобальта, никеля, кадмия, а в донных отложениях – цинка, железа, свинца, кобальта, никеля и кадмия (Сорока, 2010). При оценке степени биологической активности ионов металлов, как правило, учитывают их подвижное содержание. Поэтому нами исследовано содержание подвижных форм Zn, Mn, Fe, Cu, Pb, Co, Ni, Cd в организме ряски в течение июня-сентября 2010 г.

Клеточные мембраны выделяли согласно методики Финдлей и Эванз (1990), модифицированной Костюк (2011). Из гомогенатов биомассы водных растений, полученных в механическом гомогенизаторе при 7000 об./мин в 5 мМ трис-НСl буфере (рН 7,6), содержащем 0,5 М сахарозы, 0,005 М ЭДТА, 0,01 М КСl и 0,001 М MgCl₂ (сырая масса: объем буфера – 1:5), путем центрифугирования при 5000 об./мин в течение 15 мин. получали осадок, содержащий клеточные мембраны. Последний ресуспензировали в верхней фазе раствора, полученного смешиванием растворов 0,25 М сахарозы и 30%-ного полиэтиленгликоля в 0,2 М растворе фосфата натрия, предварительно выдержанного 24 ч при 4°C. Суспензию распределяли поровну в три поликарбонатные пробирки объемом 50 мл, в каждую добавляли 10 мл нижней фазы смеси вышеуказанных растворов, смешивали и центрифугировали при 2000 g 15 мин. в бакет-ротаторе. Мембранный материал отбирали в месте разделение фаз с помощью шприца. Все процедуры осуществлены при 4°C. Морфологические изменения в мембранах фиксировали микроскопически (МБИ-15 с последующим интегрирующим цифровым анализом на комплексе "SSTU-camera Manual Vision SSD-color-WOYV00020) после их окраски "хлор-цинк-йод" реактивом (Broda, 1971).

Содержание ВМ в ряске определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на спектрофотометре С-115 при длинах волн, соответствующих максимуму поглощения каждого из исследуемых металлов, после сжигания высушенных образцов растения в HNO₃ (1,35 г/см³) с последующим окислением H₂O₂ при нагревании в течение 1 часа. Содержание металлов выражали в мг на 1 кг сухой массы исследуемых образцов. Статистическую обработку полученных данных осуществляли методом (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование концентрической мембранной системы в клетках ряски выявлено уже в начале исследования в июне (рис. 1а). Радиусы клеток до первичной и вторичной мембраны составляли в среднем 8,7 и 5,3 мкм соответственно. При этом наблюдалось уменьшение объема внутриклеточного пространства и уплотнение мембран. Содержание цинка, меди, свинца и кобальта в течение экспериментального периода было самым высоким и составила соответственно: 10,12 мг/кг, 4,51, 8,50 и 3,42 мг/кг. В июне также обнаружены максимальные показатели содержания в ряске марганца и никеля – 45,26 мг/кг и 10,47 мг/кг. Таким образом, июнь характеризуется наивысшими показателями содержания у ряски Zn, Cu, Pb, Co, Mn и Ni, что может быть причиной выявленных структурных изменений мембран, поскольку ТМ обладают выраженными токсическими свойствами, особенно при комплексном влиянии, а внутриклеточные процессы могут быть проявлением «неспецифического адаптационного синдрома» (Растение и стресс, 2008).

В июле радиусы клеток до первичной и вторичной мембран составляли 10,5 и 9,4 мкм (рис. 1б). В отличие от июня процесс формирования концентрической мембраны был менее выражен. Визуально вид клеток более, чем в предыдущем месяце, был близким к физиологической норме. Поскольку в июле наблюдалось некоторое снижение содержания тяжелых металлов и выявлено их наименьшие значения для Zn, Cu, Co – 9,17 мг/кг, 2,58 и 2,32 мг/кг соответственно, а также зафиксировано значительное уменьшение содержания марганца и никеля по сравнению с предыдущим месяцем (Mn – более, чем в 2 раза – до 19,67 мг/кг), предполагаем что стабилизация состояния клеток связана с этим напрямую.

В августе (рис. 1в) в клетках ряски наблюдалось значительное уменьшение ядерно-цитоплазматического пространства (по сравнению с июлем), толщина мембран увеличилась, радиус клеток до первичной и вторичной мембран составлял 11,4 и 7,6 мкм соответственно. В этот месяц растение характеризуется повышенным содержанием Zn, Cu, Co, Mn и Ni в ряске относительно июля, в 1,42 раза относительно июня также увеличилось содержание Fe.

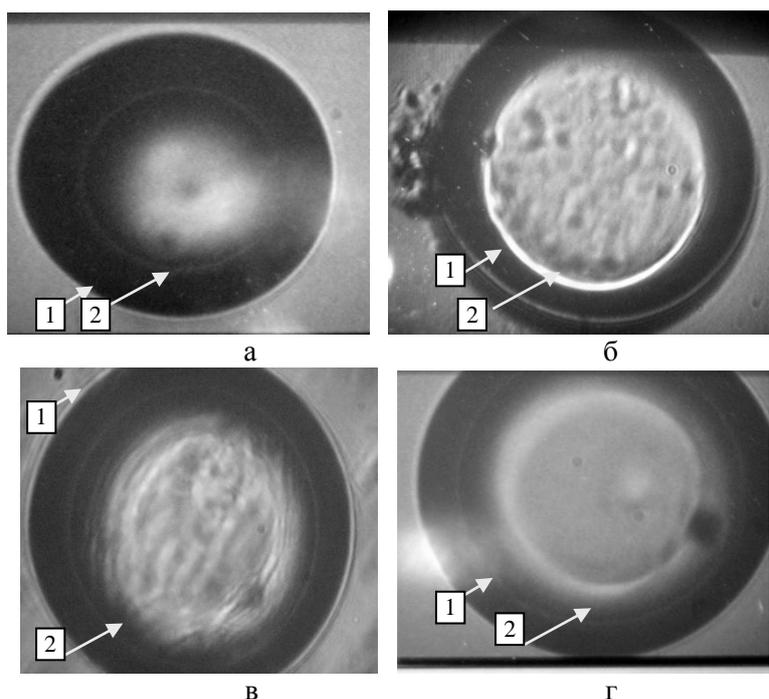


Рис.1. Формирование вторичной концентрической мембраны в клетках ряски в июне (а), июле (б), августе (в) и сентябре (г); (1 – первичная мембрана; 2 – вторичная мембрана)

В сентябре (рис. 1г) радиус клеток до первичной и вторичной мембран составлял 8,7 и 6,3 мкм соответственно. Состояние клеток характеризуется стабилизацией внутриклеточного пространства, ярко выражен двойной мембранный комплекс. Содержание марганца и никеля у *Lemna minor* L в сентябре самое низкое – 6,76 мг/кг и 7,69 мг/кг соответственно. Несколько увеличилось содержание в ряске Cu, Pb, Co, Zn. Содержание железа – максимальное 90 мг/кг. Если предыдущие месяцы характеризовались лишь следовыми количествами кадмия, то в сентябре его содержание в ряске достигает 0,49 мг/кг.

Соотношение радиусов клеток до первичной и вторичной мембран составляло: в июне – 1,6; в июле – 1,1; в августе – 1,5; в сентябре – 1,3, что совпадает с динамикой концентрации тяжелых металлов в ряске: чем выше содержание тяжелых металлов, тем более ярко выражено формирование вторичного мембранного комплекса и тем больше соотношение радиусов первичной и вторичной мембран. По уровню подвижного содержания ВМ за исследуемый период в *Lemna minor* L можно представить рядом: Cd <Co <Cu <Pb <Ni <Zn <Mn <Fe.

Таким образом, степень сформированности двойной концентрической мембранной системы и радиус клеток *Lemna minor* L. до первичной и вторичной мембран изменяется на протяжении вегетационного периода. Предполагаем, что это связано с уровнем содержания в ряске тяжелых металлов. Связывая эти данные с динамикой содержания ТМ в воде и донных отложениях (Андрусишин, 2011), объясняем проявленную динамику: увеличением скорости перехода от весны до осени подвижных форм металлов из донных отложений в воду и активным поглощением металлов клетками водных растений в связи с увеличением их физиологической активности, ускорением их вегетации и увеличением биопродуктивности.

Предлагаем использовать выявленный эффект для биомониторинга загрязнения водоемов тяжелыми металлами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрусишин Т.В. Біогенні важкі метали у воді, донних відкладах та прибережних ґрунтах річки Збруч // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. вип.: Фізіолого-біохімічні та екосистемні механізми формування токсикорезистентності біологічних систем. Тернопіль, 2011. Вип. 2 (47). С. 51–58.
2. Брагина Н.А. Мембранология. Учебно-методическое пособие. М.: ИПЦ МИТХТ, 2002. 98 с.

3. Грубинко В.В., Костюк К.В. Структурные изменения в клеточных мембранах водных растений при воздействии токсических веществ // Гидробиол. журн. 2011. Т. 47, № 6. С. 43–58.
4. Костюк К., Грубинко В. Вплив іонів цинку, свинцю та дизельного палива на ліпідний склад мембран клітин водних рослин // Вісник Львівського ун-ту. Сер.: біологічна. 2010. Вип. 54. С. 257–264.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Растение и стресс. Курс лекций / Уральский государственный университет им. А.М. Горького. Екатеринбург, 2008. 267 с.
7. Сорока, Т.В. Вміст важких металів в абіотичних компонентах р. Збруч восени // Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. вип.: Гідроекологія. Тернопіль, 2010. Вип. 2(43). С. 463–467.
8. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен [отв. ред. Н.Н. Немова]; Институт биологии КарНЦ РАН. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 172 с.
9. Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы / Пер. с англ. М.: Мир, 1990. 423 с.
10. Broda B. Metody histochemii roslinnej. Warszawa: Panstwowy zaklad wydawnictw lekarskich, 1971. 255 p.

STRUCTURAL CHANGES OF THE CELL MEMBRANES OF *LEMNA MINOR* L. IN THE POLLUTED RIVER BY THE HEAVY METALS

T.V. Andrusishin, V.V. Grubinko

We investigated the formation of a double concentric membrane system in *Lemna minor* L. from the river Zbruch (Voločisk, Khmelnytsky region). The intensity of the formation of a double concentric membrane system in the cells of duckweed during June-September 2010 is determined by the level of the heavy metals (Zn, Cu, Co, Fe, Pb, Ni, Mn, Cd) in the water due to their toxicity. Research suggests the possibility of formation of a double concentric membrane system in the cells of duckweed as the biomonitoring of the pollution of natural waters by the heavy metals.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РЕК ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ НА ГИДРОБИОНТОВ

Артеменко С.В., Петухова Г.А.

Тюменский государственный университет, г. Тюмень, Россия

E-mail: artbot89@mail.ru

По обширности пространства и резко дифференцированной плотности населения, богатству ресурсами и контрастом уровня жизни людей, разнообразию культурных традиций и сложнопостроенности политических институтов Тюменский регион во многом напоминает Россию в целом (Беляева, 2008). В 2010 г. по Тюменской области численность городского населения области составила 2 653 456 человек, или 78,1% (в 2002 г. – 60,5%), сельского – 742 299 человек, или 21,9 % (в 2002 г. – 39,5%).

Рост городского населения говорит о развитии и увеличении объемов промышленности. Основные отрасли промышленности: нефтеперерабатывающая, легкая и пищевая, машиностроение (транспортное, ремонтные предприятия), строительная индустрия. Отрасли нефтегазового комплекса традиционно занимают ведущее место в экономике Тюменской области. Рост городов и промышленных комплексов сказывается на водопотреблении населения. Средняя норма водопотребления на текущий период составляет 6 м.куб на человека в день. Например, г. Тюмень снабжается водой от нескольких водозаборов: Метелевский, Головной, Велижанский. Класс качества воды в реке, при этом, расценивается от категории «грязная» до «чрезвычайно грязная». Из вышеизложенного ясно, что мониторинг состояния водоемов чрезвычайно важен и необходим как с экологической, санитарно-гигиенической сторон, так и с экономической. Одним из наиболее эффективных и краткосрочных видов мониторинга, в плане прогноза последствий загрязнения, является биологический, основывающийся на реакциях гидробионтов.

В ходе данного исследования были изучены участки рек Елыково и Туры, расположенные на территории Тюменской области. Река Елыково расположена в лесном массиве в 70 км. от г. Ханты-Мансийска. На её левом берегу располагаются полигоны по

захоронению отходов нефтедобывающего комплекса. Река Тура является типичным примером проточного водоёма для юга Тюменской области. Степень очистки сточных вод современными очистными сооружениями недостаточна для обеспечения необходимого качества вод, невозможно подвергнуть очистке и сток загрязнений с сельхозугодий. Кроме того, для сибирского региона характерна низкая способность к самоочищению водных объектов, слабая активность почвенных биоценозов, низкий потенциал самоочищения почв и длительный процесс разложения в почвах органических веществ до 10 и более лет. Основные источники загрязнения поверхностных вод: сточные воды предприятий, жкх, теплоэнергетики, металлургической, химической, нефтехимической, радиоэлектронной, лесной и деревообрабатывающей промышленности. Свойства и качество воды зависят от состава и концентрации содержащихся в ней веществ. Поступающие в водоемы загрязнители обычно включаются в круговорот веществ и претерпевают различные физико-химические превращения. Малостойкие, простые твердые и летучие вещества оседают на дно или улетучиваются, окисляются или разлагаются под действием микроорганизмов и быстро подвергаются детоксикации. Они оказывают на гидробионтов прямое токсическое или косвенное воздействие, ухудшая физические свойства воды, газовый и солевой режимы водоемов. Поскольку любые сточные воды имеют сложный, многокомпонентный химический состав, необходимо учитывать их комбинированное действие. Последнее проявляется в виде синергизма, антагонизма и суммированного (аддитивного) действия (Будников, 1998). Рядом исследователей показано, что для брюхоногих моллюсков, как и для многих других водных животных (ракообразных, рыб, земноводных, пресмыкающихся), сигналами пищи могут служить не только сложные по составу экстракты растительной и животной пищи, но и отдельные химические вещества, в частности свободные аминокислоты. Синергизм четко проявляется в комбинациях тяжелых металлов, аммиака и меди, фенола и ПХП, меди и СПАВ. Вследствие этого смеси даже субтоксических концентраций этих веществ могут оказаться смертельными (Калиненко, 2006). Антагонистами являются ионы кальция по отношению к натрию, магнию и калию. Токсичность солей цинка и свинца снижается в присутствии соединений кальция, а синильной кислоты в присутствии окиси и закиси железа. В эксперименте с р. Елыково в 2009-11 гг. было забрано 4 пробы воды из реки. Река 0 была выбрана, как вышележащий по течению реки, соответственно, было исключено влияние веществ попадающих в реку ниже по течению. На площади между участками Река 0 и Русло 1 расположен Куст 116. Районы Русло 1 и Русло 2 разделены мостом, по которому проходит автотрасса. Название участка Меление говорит об особенностях рельефа дна на данном промежутке реки. На повышении рельефа наблюдается зарастание травами и пр. высшей растительностью. В период с августа 2009 г. по июнь 2010 г. на реке произошёл локальный немногочисленный разлив продуктов нефтепереработки, а также последующие операции по его ликвидации. В эксперименте с р. Турой в 2009-11 гг. было забрано 5 пробы непосредственно из русла: пос. Док, мост Челюскинцев, Залымский пережат, с. Каскара, 3 км. за с. Каскара. Район пос. Док расположен выше остальных по течению реки. Река в районе мостов испытывает техногенное влияние, вследствие конденсации выхлопных газов. Исследование проводилось на таких тест-объектах, как инфузория-туфелька *Paramecium Caudatum* и катушка роговая *Planorbis corneus*. При выявлении реакций гидробионтов на воду рек использовались стандартные методики. Пробы воды с различных участков р. Елыково были протестированы на следующие химические показатели: рН, Fe^{2+} , NH_4^+ , ПАВ, NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , F^- , Cl^- , масла и нефтепродукты. Анализируя изменения химического состава воды в начале и в конце рассматриваемого отрезка реки, видим снижение рН с 7,0 до 6,0 (меньше ПДК). Семикратное превышение ПДК нефтепродуктов на протяжении исследуемого участка реки. Стабильность концентрации ПАВ обеспечивается особенностью участка Меление. Также наблюдаем относительное увеличение концентраций NH_4^+ и Cl^- . Вода из реки Туры была так же, как и река Елыково, протестирована на наличие химических соединений и веществ в 2009 и 2011 гг.

Как видно из табл. 1, наблюдается многократное превышение ПДК ПАВ во всех пробах воды из реки Туры, а также локальное превышение ПДК нефтепродуктов в зонах высокой техногенной нагрузки. В соответствии с уровнем техногенной нагрузки была выявлена и специфическая реакция гидробионтов. Численность инфузорий в речной воде ниже ($P < 0,05$) контрольной, т.о. можно говорить о токсичности воды из реки Елыково. Наименьшая

численность инфузорий установлена в пробах До меления и Русло 3. На участке После меления выживающих инфузорий больше ($P < 0,05$) по отношению к предыдущему участку реки, что говорит о снижении токсичности вод.

Таблица 1. Концентрация веществ в воде участков реки Туры

| | pH | NO ₂ (мг/л) | NO ₃ (мг/л) | NH ₄ ⁺ (мг/л) | Fe (мг/л) | PO ₄ ⁻ (мг/л) | Cl ⁻ (мг/л) | ПАВ (мг/л) | F ⁻ (мг/л) | Фенолы (мг/л) | Нефтепродукты (мг/л) |
|-------------------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|------------------------|------------|-----------------------|---------------|----------------------|
| Пос. Док | 7,5 | 0,02 | 1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 24,8 5 | <u>2</u> | 0 | 0 | 0,1 |
| Мост Челюскинцев | 6,5 | 0,02 | 1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 21,3 | <u>2</u> | 0 | 0 | <u>0,5</u> |
| Зальмский пережат | 7,0 | 0,00 | 0 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 21,3 | <u>2</u> | 0 | 0,02 | <u>1,0</u> |
| С. Каскара | 6,5 | 0,10 | 5 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 28,4 | <u>2</u> | 0 | 0 | 0,1 |
| За с. Каскара | 6,5 | 0,02 | 1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 28,4 | <u>2</u> | 0 | 0 | 0,1 |
| ПДК | 6,5-8,0 | 0,5 | 50 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 300 | 0 | 0 | 1,0 | 0,3 |

Условные обозначения: выделенные значения превышают значения ПДК

Двигательная активность инфузорий на участках Река 0 и До меления снижена ($P < 0,05$). Рост данного показателя на последующих участках является следствием того, что часть полутантов оседают на участке Меление. Реакция моллюсков является более сложной. Меньшая устойчивость у моллюсков отмечена по отношению к воде с участка Русло 3.

Таблица 2. Физиологические и поведенческие показатели инфузорий в воде из реки Елыково

| Объект | Численность, шт. | | Двигательная активность, % | |
|---------------|------------------|-----------|----------------------------|------------|
| | 1 сутки | 9 сутки | 1 сутки | 9 сутки |
| Контроль * | 11,7±0,56 | 11,9±0,61 | 27,3±2,42 | 33,0±2,40 |
| Река 0 | 7,9±0,76* | 8,1±0,78* | 10,4±3,33* | 8,0±3,42* |
| До меления | 4,8±0,47* | 6,2±0,55* | 23,4±4,37 | 23,7±3,66* |
| После меления | 6,4±0,48* | 8,0±0,84* | 36,9±5,99 | 72,1±6,28* |
| Русло 3 | 3,8±0,22* | 5,8±0,60* | 27,9±4,84 | 66,9±5,36* |

Условные обозначения: * - достоверное различие с контролем ($P < 0,05$)

Таблица 3. Физиологические и поведенческие показатели брюхоногих моллюсков (*Planorbis Corneus*) в воде из реки Елыково

| Объект | Выживаемость, % | Привес, мг. | Поедаемость корма, мг. | |
|---------------|-----------------|-------------|------------------------|-------------|
| | 16 сутки | 16 сутки | 1 сутки | 16 сутки |
| Контроль * | 100-0,18 | 42,9±4,11 | 35,8 ±4,98 | 31,4±2,24 |
| Река 0 | 83,3±8,79* | 25,9±1,67* | 21,6±0,72* | 27,8±3,06* |
| До меления | 88,9±7,40 | 40,9±4,00 | 24,5±2,07* | 67,6±1,75* |
| После меления | 100-0,18 | 19,9±1,86* | 324,8±1,24* | 168,7±3,15* |
| Русло 3 | 77,8±9,80* | 28,4±2,93* | 52,1±1,36* | 16,3±1,06* |

Условные обозначения: * - достоверное различие с контролем ($P < 0,05$)

Вспомним, что реакция инфузорий также негативна. Комбинированный анализ таких показателей как Привес моллюсков и Поедаемость корма говорит об активности борьбы со стрессовыми факторами. Моллюски питались активнее в воде из участка Река 0, при этом

Привес ниже контроля ($P < 0,05$), что говорит о наличии в воде токсиканта. На участке До меления привес на уровне контроля, что, вероятно, вызвано наличием веществ, изменяющих активность питания. На участке Русло 3 отмечено снижение обоих показателей, вероятно, объясняется наличием комплекса веществ, подавляющего запуск ответной реакции на стресс.

Физиологические и поведенческие показатели инфузорий и моллюсков в целом указывают на токсичность воды с участков До меления и Русло 3. При этом наблюдается специфическая для каждого организма реакция на воду других участков реки Ельково. В силу различий гидрологического режима и величины техногенного влияния рек Ельково и Туры установлено различие и в комбинациях ответных реакций гидробионтов. Установлено, что по окончании эксперимента численность клеток тест-объекта в речной воде во много раз больше, чем в отстоянной воде. В речной воде предполагается большее число бактерий.

Таблица 4. Физиологические и поведенческие показатели инфузорий в воде из реки Туры

| Объект | Численность, шт. | | Двигательная активность, % | |
|---------------------|------------------|------------|----------------------------|------------|
| | 1 сутки | 9 сутки | 1 сутки | 9 сутки |
| Контроль * | 11,7±0,56 | 11,9±0,61 | 27,3±2,42 | 33,0±2,40 |
| пос. Док | 26,1±2,52* | 22,1±2,21* | 13,0±1,15* | 13,6±1,42* |
| мост Челюскинцев | 43,8±3,97* | 29,6±2,91* | 13,3±1,35* | 8,6±0,98* |
| Залымский Перекат | 38,7±3,23* | 19,4±1,64* | 18,6±1,56* | 5,7±0,38* |
| с. Каскара | 31,7±3,25* | 34,2±3,54* | 29,4±2,73 | 21,5±0,97 |
| 3 км. За с. Каскара | 30,7±3,39* | 28,1±2,67* | 25,3±2,28 | 33,8±3,21 |

Условные обозначения: * - достоверное различие с контролем ($P < 0,05$)

Активно питаюсь, инфузории в короткие сроки размножились в речной воде. При прошествии нескольких дней их численность сократилась, практически, в два раза в воде с участка Залымский перекаат, что указывает на влияние токсичных веществ. Отмечено резкое снижение показателя и в воде из района моста Челюскинцев, т.е. зоне предшествующей Залымскому перекаату.

Для расширения и уточнения на отмеченных участках анализируется поведенческий показатель – двигательная активность. Отмечено резкое снижение активности движения парамеций в воде с участков мост Челюскинцев и Залымский перекаат, что отражает реакцию на наличие токсикантов. Статистически достоверных различий по данному показателю не обнаружено для участков с. Каскара и за с. Каскара, что говорит об отсутствии влияния токсикантов. При обилии пищи на участке пос. Док активность инфузорий снижена, что говорит о токсичности воды.

Таблица 5. Физиологические и поведенческие показатели брюхоногих моллюсков (*Planorbis Corneus*) в воде из реки Туры

| Объект | Выживаемость, % | Привес, мг. | Поедаемость корма, мг. | |
|---------------------|-----------------|-------------|------------------------|-------------|
| | 16 сутки | 16 сутки | 1 сутки | 16 сутки |
| Контроль * | 100-0,18 | 153,3±10,33 | 100,2±15,33 | 100,2±10,13 |
| пос. Док | 94,4±4,21 | 70,0±6,47* | 135,0±2,86* | 120±3,57* |
| мост Челюскинцев | 86,8±7,40* | 50,0±5,33* | 360,0±4,81* | 360,0±5,39* |
| Залымский Перекаат | 66,0±11,03* | 30,0±2,67* | 220,0±3,48* | 260,0±5,85* |
| с. Каскара | 75,9±9,80* | 60,0±5,99* | 680,0±10,58* | 600,0±7,64* |
| 3 км. За с. Каскара | 80,4±8,98* | 80,0±8,22* | 150,0±4,16* | 275,0±3,33* |

Условные обозначения: * - достоверное различие с контролем ($P < 0,05$)

Вероятно, токсиканты приносятся с течением с вышерасположенных участков, в отличие от участка моста Челюскинцев, где очевидно техногенное влияние. Установлено, что участок Залымский пережат выполняет роль фильтра загрязнения, что отражается на особенностях воды на данном участке. Данный факт подтверждается высокой смертностью моллюсков в воде с этого участка реки.

Выживаемость моллюсков в речной воде снижена по отношению к контролю ($P < 0,05$), что указывает на токсичность речной воды на исследуемом отрезке. Выявлена реакция на токсичные комплексы специфического действия на участках Залымский пережат и с. Каскара. Отмечено снижение привеса на всех участках, где проводился забор воды на р. Туре по отношению к контролю. Участок реки Залымский пережат способствует концентрации веществ из проточной воды, что отражается на реакции моллюсков. В частности, снижение выживаемости, привеса, а также повышении поедаемости катушек роговых. Физиологические и поведенческие показатели исследуемых гидробионтов указывают на высокие концентрации загрязнителей воды на участках мост Челюскинцев и Залымский пережат. Кроме того, обнаруживается специфический ответ на воду участков с. Каскара и за с. Каскара. Основываясь на проведенных химическом и биологическом анализах воды можно заключить, что биологический мониторинг даёт более сложное и вместе с тем подробное описание. Установлено негативное влияние техногенного химического комплекса в воде на физиологические и поведенческие реакции гидробионтов. Отмечена специфическая реакция исследуемых гидробионтов на комбинированные техногенные влияния, в т.ч. блокирование ответной реакции на стрессовость среды. На основе реакций гидробионтов были выявлены наиболее загрязнённые участки рек: До меления, Русло 3 (р. Елыково); мост Челюскинцев, Залымский пережат (р. Тура). Два участка загрязнены в силу особенностей рельефа дна, т.е. удерживают токсиканты, поэтому они могут быть рекомендованы для проведения точечной очистки, с целью стимуляции самоочистки речных систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева, Л.А. Тюменский регион в современной фазе социокультурной эволюции России / Л.А. Беляева, Г.С. Корепанов, Г.Ф. Куцев, Н.И. Лапин // Мир России. 2008. №1. 50-88 с.
2. Будников, Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем / Г.К. Будников // Биология. 1998. № 6 23-29 с.
3. Калинин, Н.А. Загрязнение р. Иртыш солями тяжелых металлов и их влияние на растительный мир водоема / Н.А. Калинин, О.А. Макарова // Электронный научный журнал «Вестник Омского государственного педагогического университета». 2006. [электронный ресурс] - <http://www.omsk.edu/article/vestnik-omgpu-46.pdf>

EFFECT OF INDUSTRIAL POLLUTION OF SOME RIVERS IN THE TYUMEN REGION ON HYDROBIONTS

Artemenko S.V., Petuhova G.A.

This article focuses on studying the effect of industrial pollution of rivers on aquatic organisms. Revealed the most polluted Elykovo and Tura river's stretches, located in the Tyumen region. Studied the specific reactions of infusorians and mollusks for contamination at each test site of the river.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОЦЕСС МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У ВЕСЛОНОСА И СТЕРЛЯДИ

Бедняков Д.А., Неваленный А.Н., Новинский В.Ю.

*ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет», Астрахань, Россия
E-mail: nevalennyu@rambler.ru*

Снижение численности осетровых видов рыб в настоящее время является одной из существенных экологических проблем. Товарное выращивание осетровых может быть использовано как один из способов ее решения. Удобным объектом для прудового выращивания ввиду некоторых своих особенностей является представитель американской

фауны отряда осетрообразных (Acipenseriformes) - веслонос (*Polyodon spathula Walbaum*). В отличие от остальных осетровых, веслонос - зоопланктонофаг, что делает эффективным его разведение в поликультуре, включающей фитопланктофага белого толстолобика, зоопланктофага веслоноса и бентофагов - стерляди или осетра (Adams, 1942; Houser, Bross, 1959; Carlson, Bonislavsky, 1981; Виноградов, Ерохина, 1976; Пономарев, Иванов, 2009). В то же время, пока не были в достаточной мере изучены особенности функционирования пищеварительной системы веслоноса.

Также стоит отметить, что сравнительный анализ особенностей пищеварительной системы веслоноса с особенностями других осетровых может являться основой для изучения адаптационных механизмов пищеварительной системы.

Целью данной работы являлось исследование влияния температуры и концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса и стерляди.

Материал был собран и обработан в 2008-2011 гг. Были использованы годовики веслоноса и стерляди, выращенные в искусственных условиях. Пойманных рыб в специальных емкостях в течение 1-2 ч доставляли в лабораторию, где у них на холоду изымали желудочно-кишечный тракт и специальным скребком снимали слизистую оболочку кишечника. Готовили суммарные пробы, в состав которых входила слизистая от 3-5 экз. Слизистую тщательно перемешивали и отбирали аликвоту для приготовления исходного гомогената. Гомогенаты готовили при помощи гомогенизатора (лабораторный гомогенизатор Daihan Scientific), добавляя охлажденный до 2-4 °С раствор Рингера для холоднокровных животных (109 мМ NaCl, 1,9 мМ KCl, 1,1 мМ CaCl₂, 1,2 мМ NaHCO₃) в соотношении 1:49. При исследовании влияния температуры содержимое пробирок инкубировали в диапазоне 0 - 70 °С для щелочной фосфатазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ и 0 - 60 °С для α-амилазы (при pH 7,4). Определение влияния pH проводили в диапазоне 3.0 - 12.0., при температуре инкубации 25 °С.

Уровень активности α-амилазы (КФ 3.1.1.1) определялся по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя, уровень активности мальтазы (КФ 3.2.1.20) модифицированным глюкозооксидазным методом, щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) - по степени гидролиза п-нитрофенилфосфата. Казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) в нейтральной (pH = 7.4) среде определяли модифицированным методом Ансона (Неваленный и др., 2005). В качестве субстратов были использованы: 0.1% раствор крахмала для α-амилазы, 0,6 мМ раствор п-нитрофенилфосфата для щелочной фосфатазы, 2% раствор мальтозы для мальтазы, приготовленные на растворе Рингера и 1% раствор казеина для казеинлитических протеиназ, приготовленный на фосфатном буферном буфере (1/15 М Na₂HPO₄ · 2H₂O и 1/15 М KH₂PO₄ в соотношении 4:1 соответственно). Активность фермента выражали в мг или мкмоль продуктов гидролиза, образующихся за 1 минуту инкубации в расчете на 1 г влажной массы ткани. Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам (Глинский, Ионин, 2002). Данные обрабатывали с использованием приложения EXCEL программы MS Office для WINDOWS XP.

Известно, что активность пищеварительных ферментов рыб зависит от многих факторов внешней среды. Температура - один из ключевых факторов, определяющих изменение скорости каталитических реакций в организме. Изучение закономерностей влияния температуры на уровень активности пищеварительных ферментов позволяет сделать выводы об эффективности адаптации того или иного вида к условиям обитания (Уголев, Кузьмина, 1993; Голованова и др., 2002; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005; Кузьмина, Ушакова, 2007а,б).

При наших исследованиях температурный оптимум для мальтазы слизистой оболочки кишечника веслоноса был установлен при 60 °С и был равен 9,20±0,17 мкмоль/г·мин. Для казеинлитических протеиназ оптимум установлен также при 60 °С и равен 17,71±0,07 мкмоль/г·мин. Для щелочной фосфатазы оптимум активности наблюдался при 55 °С и был равен 1,87±0,02 мкмоль/г·мин. Зона оптимальных значений для α-амилазы была смещена в сторону более низких температур - 20-30°С и уровень активности составлял 11,76±0,43 и 12,10±0,17 мг/г·мин.

Для стерляди температурный оптимум кишечной мальтазы был установлен при 60°С и уровень активности составлял 20,15±0,13 мкмоль/г·мин. Для щелочной фосфатазы оптимум был найден в диапазоне 55-60°С и уровень активности в этом диапазоне составлял 1,24±0,01

мкмоль/г·мин. Для казеинлитических протеиназ оптимальные значения уровня активности были получены при 50°C и были равны $4,51 \pm 0,08$ мкмоль/г·мин. В случае с α -амилазой оптимум активности располагался в диапазоне 30-40°C и значения уровня активности составляли $11,05 \pm 0,40$ мг/г·мин и $10,97 \pm 0,08$ мг/г·мин.

Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что ферментные системы, обеспечивающие гидролиз компонентов пищи у рыб адаптированы к функционированию в широком диапазоне температур (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Голованова и др., 2002; Неваленный и др., 2003; Кузьмина 2005; Коростелёв, Неваленный, 2005).

Ранее было продемонстрировано, что наибольшей активностью пищеварительные ферменты рыб обладают в определенном диапазоне концентрации водородных ионов. Пищеварительный тракт рыб в естественных условиях находится в прямом контакте с внешней средой, а его содержимое может быть рассмотрено как часть окружающей среды (Thomas, 1964; Кузьмина, Неваленный, 1983 и др.). Следовательно, рН окружающей среды может непосредственно влиять на концентрацию водородных ионов в желудочно-кишечном тракте и соответственно, на активность ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение. При исследовании характеристик пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника большинства видов рыб отмечена довольно широкая зона оптимальных значений рН (Неваленный и др., 2003; Кузьмина, Ушакова, 2007а,б).

При исследовании влияния концентрации водородных ионов на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса нами было установлено, что зона оптимальных значений для α -амилазы находится в диапазоне рН от 7.0 до 9.0 и уровень активности при этих значениях составляет $9,16 \pm 0,23$ мг/г·мин, $9,49 \pm 0,23$ мг/г·мин и $8,75 \pm 0,17$ мг/г·мин соответственно. Для мальтазы диапазон оптимальных значений был установлен при рН 7.0-8.0 и уровень активности был равен $6,93 \pm 0,14$ мкмоль/г·мин и $6,96 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин. Для щелочной фосфатазы оптимум активности был установлен при рН 9.0 и уровень активности составлял $0,48 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин. Для казеинлитических протеиназ оптимум активности был найден при рН 11.0 и уровень активности составлял $1,19 \pm 0,02$ мкмоль/г·мин.

При исследовании влияния концентрации водородных ионов на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника стерляди было установлено, что зона оптимальных значений для α -амилазы находится в диапазоне рН от 7.0 до 9.0 и уровень активности при этих значениях составляет $8,62 \pm 0,16$ мг/г·мин, $9,05 \pm 0,05$ мг/г·мин и $8,66 \pm 0,27$ мг/г·мин соответственно. Для мальтазы диапазон оптимальных значений был установлен при рН 8.0 и уровень активности был равен $14,56 \pm 0,11$ мкмоль/г·мин. Для щелочной фосфатазы оптимум активности был установлен при рН 9.0 и уровень активности составлял $0,27 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин. Для казеинлитических протеиназ оптимум активности был найден при рН 10.0-11.0 и уровень активности составлял $10,17 \pm 0,13$ мкмоль/г·мин и $10,17 \pm 0,09$ мкмоль/г·мин соответственно.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было продемонстрировано, что исследованные пищеварительные ферменты веслоноса и стерляди адаптированы к широким диапазонам температуры и концентрации водородных ионов. Были выявлены индивидуальные адаптации этих видов к влиянию исследованных факторов. Были отмечены такие общие закономерности для исследованных видов, как высокие температурные оптимумы для собственнокишечных ферментов и сдвиг оптимальных значений рН в щелочную сторону.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградов В.К., Ерохина Л.В. 1976. Новые объекты рыбоводства и акклиматизации // Рыбное хоз-во. № 10. С. 10-13.
2. Глинский В.В., Ионин В.Г. 2002. Статистический анализ: Руководство по обучению. М.: ИНФРА-М, Новосибирск: Сибирское соглашение, 241 с.
3. Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Голованов В.К. Воздействие высоких температур на пищеварительные гидролазы серебряного карася *Carassius auratus* // Вопр. ихтиологии. Т. 42. № 1. С. 121-128.
4. Коростелёв С.Г., Неваленный А.Н. 2005. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника карповых рыб // Вопр. ихтиологии. Т. 45. № 2. С. 225-235.
5. Кузьмина В.В. 2005 Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука, 300 с.

6. Кузьмина В.В., Неваленный А.Н. Влияние концентрации водородных ионов на активность карбогидраз пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиологии. 1983. Т. 23. № 3. С. 481-490.
7. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. 2007а. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ слизистой оболочки пищеварительного тракта типичных и факультативных ихтиофагов // Вопр. ихтиологии. Т. 47. № 4. С. 566-573.
8. Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. 2007б. Влияние температуры, рН и тяжелых металлов (медь, цинк) на активность протеиназ потенциальных объектов питания типичных и факультативных ихтиофагов // Вопр. ихтиологии. Т. 47. № 6. С. 837-846.
9. Неваленный А.Н., Туктаров А.В., Бедняков Д.А. 2003. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. Астрахань: ФГОУ ВПО «Астрахан. гос. техн. ун-т», 152 с.
10. Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Дзержинская И.С. 2005. Энзимология. Астрахань: ФГОУ ВПО «Астрахан. гос. техн. ун-т», 102 с.
11. Пономарев С.В., Иванов Д.И. 2009. Осетроводство на интенсивной основе. М.: Колос, 312 с.
12. Уголев А.М. 1985. Эволюция пищеварения и принципы эволюций функций: Элементы современного функционализма. Л.: Наука, 544 с.
13. Уголев А.М., Кузьмина В.В. 1993. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 283 с.
14. Adams L.A. 1942. Age determination and rate of growth in *Polyodon spathula*, by means of the growth rings of the otoliths and dentary bone // Amer. Midland Naturalist. V. 28, № 3. P. 617-630.
15. Carlson D.M., Bonislawsky P.S. 1981. The paddlefish (*Polyodon spathula*) fisheries of the midwestern United States // Fisheries. V. 6, № 2. P. 17-22.
16. Houser A., Bross M.G. 1959. Observations on the growth and reproduction of the paddlefish // Trans. Amer. Fish. Soc. V. 88, № 1. P. 50-52.
17. Thomas J.E. 1964. Organ system in adaptation: The digestive system // Handbook of physiology. Sec. 4. Ch. 12. Washington: Acad. Press. P. 193-214.

STUDY OF SOME CHARACTERISTICS OF ENZYMES, PROVIDES A PROCESS MEMBRANE DIGESTION OF PADDLEFISH AND STERLET

A.N. Nevalenny, D.A. Bednyakov, V.Yu. Novinsky
FSBEI HPE "Astrakhan State Technical University", Astrakhan
E-mail: nevalenny@rambler.ru

A study was conducted the influence of temperature and concentration of hydrogen ions on the activity levels of digestive enzymes of the intestinal mucosa of paddlefish and sterlet. It is shown that the optimal values of the level of activity for maltase, caseinlithic proteinases and alkaline phosphatase found in the temperature range 50-60 °C. For α -amylase activity optimum range - 20-40 °C. Found that the optimal range of pH values have on the values of 7.0-11.0.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСПРЕССИИ И СИНТЕЗА БТШ70 У ДВУХ ВИДОВ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТИ

Бедулина Д.С.^{1,2}, Зацепина О.Г.³, Протопопова М.В.^{1,2}, Павличенко В.В.^{1,2}, Гарбуз Д.Г.³,
 Шатилина Ж.М.^{1,2}, Аксенов-Грибанов Д.В.^{1,2}, Гурков А.Н.^{1,2}, Верещагина К.П.^{1,2},
 Кондратьева Е.М.^{1,2}, Тимофеев М.А.^{1,2}, Евгеньев М.Б.³
 1. *ФГБОУ ВПО "ИГУ", Иркутск, Россия*
 2. *АНО "Байкальский исследовательский центр", Иркутск, Россия*
 3. *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*
e-mail: daria.bedulina@gmail.com

Одним из важнейших клеточных механизмов адаптации к обширному спектру протеотоксических стрессовых воздействий является экспрессия и синтез белков теплового шока (БТШ). Наиболее консервативное и изученное семейство БТШ – БТШ с молекулярной массой 70-72 килодальтон (БТШ70). Клеточные функции БТШ70 на физиологическом уровне проявляются в защите от действия большого числа стрессовых факторов, исходя из чего, их эволюционная и экологическая роль заключается в участии в механизмах адаптации к смене

условий окружающей среды (Feder, Hofmann, 1999). Одним из ключевых абиотических факторов среды, непосредственно влияющих на распространение и выживание видов, является температура. На ряде организмов показано, что развитие термотолерантности взаимосвязано со структурно-функциональными особенностями генов *bmi70*, как на уровне числа копий генов (Evgen'ev et al., 2005), так и на уровне регуляции их экспрессии (Zatsepina et al. 2000). Однако ограниченное количество изученных таксонов не позволяет в полной мере осветить взаимосвязь эволюционных преобразований системы генов *bmi70* с развитием термотолерантности.

Уникальной моделью для изучения разнообразия и эволюции механизмов адаптации является эндемичная фауна озера Байкал, развитие которой происходило длительное время в стабильных, изолированных условиях. В результате этого сформировался уникальный фаунистический комплекс с высокой степенью биоразнообразия и адаптивной радиации в ряде групп (Kozhova, Izmesteva, 1998). Одной из таких групп в озере являются амфиподы (Amphipoda, Crustacea) - ключевые представители бентосных сообществ озера, как по численности, так и по биомассе (Тахтеев, 2000). Амфиподы обитают в широком диапазоне условий среды, в том числе температурных, и представляют собой удобную модель для изучения молекулярных и клеточных механизмов стресс-адаптации (Тимофеев, 2011).

Целью исследования явилась оценка структурно-функциональных особенностей генов *bmi70* у эндемичных байкальских амфипод, различающихся по своим экологическим характеристикам. В качестве объекта исследования были выбраны два вида байкальских амфипод, контрастно отличающихся по отношению к температуре - литоральный термоустойчивый *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.) и сублиторальный термочувствительный *E. verrucosus* (Gerstf.). *E. cyaneus* является типичным представителем верхних отделов литорали с максимальной плотностью популяции в узкой береговой зоне (Вейнберг, Камалтынов, 1998). По экспериментальным данным обладает высокой терморезистентностью и предпочитает температуру 11-12 °С (Тимофеев, Кириченко, 2004). *E. verrucosus* является стенотермным холодолюбивым видом, который обитает в зоне литорали вплоть до глубины 10 – 15 м. В условиях эксперимента этот вид предпочитает температуру 5-6 °С (Тимофеев, Кириченко, 2004).

Сбор амфипод проводили на глубинах до 1 метра с использованием гидробиологического сачка. Амфипод содержали отдельно по видам, в аэрируемых аквариумах, при температуре, соответствующей температуре вылова (6-8 °С). В экспериментах использовали взрослых, здоровых и активно плавающих рачков. Предварительно акклимированных амфипод (3-5 суток) экспонировали в термостатируемых аквариумах с постоянной аэрацией. Для оценки динамики накопления и экспрессии БТШ70 и их генов использовали два экспериментальных подхода: а) плавное повышение температуры со скоростью 1°С в час; б) острое температурное воздействие при температуре 25°С с последующим восстановлением при температуре акклимации. Амфипод контрольной группы содержали в условиях, аналогичных предварительной акклимации. После экспериментов живых рачков замораживали в жидком азоте для последующего биохимического и молекулярно-биологического анализа.

В ходе исследования методами анализа и скрининга геномных библиотек, инвертированной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК были впервые получены и занесены в международную базу данных NCBI GenBank кодирующие и регуляторные нуклеотидные последовательности двух копий генов цитозольных *bmi70* байкальских эндемиков. Анализ регуляторных последовательностей полученных генов показал, что у термоустойчивого *E. cyaneus* промоторы и 3'-нетранслируемые области *bmi70* имеют более компактную структуру, что было также показано для термоустойчивых Diptera (Garbuz et al., 2011).

Методами Саузерн блоттинга и инвертированной ПЦР определили, что термоустойчивый *E. cyaneus* содержит большее количество копий генов *bmi70* в геноме, чем термочувствительный *E. verrucosus*. Полученные данные были подтверждены результатами двумерного электрофореза и последующего Вестерн блоттинга с антителами к БТШ70. При этом, у термоустойчивого *E. cyaneus* отмечали большее количество изоформ БТШ70. Методами масс-спектрометрии подтвердили, что детектированные белковые пятна являются членами семейства цитозольных БТШ70.

Анализ регуляции экспрессии генов *bmi70* методом связывания элемента с фактором теплового шока (heat shock factor – HSF) при помощи «замедления в геле» (Zatsepina et al, 2000) с использованием консенсусных HSE, меченных ^{32}P , показал, что у *E. cyaneus* присутствуют слабовыраженные комплексы HSF-HSE в контроле.

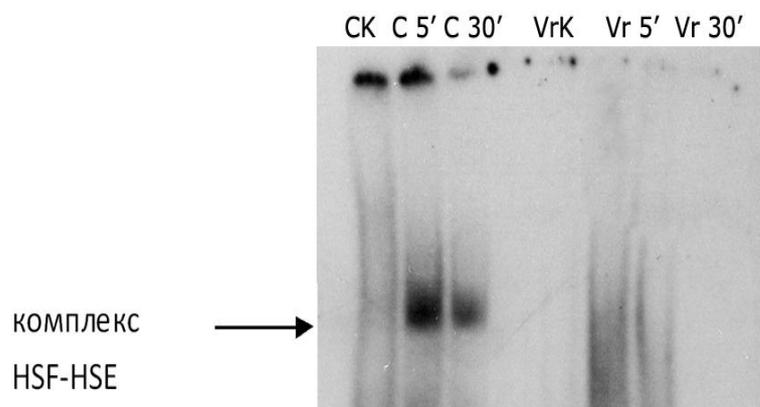


Рис. 1. Нативный электрофорез ядерного белка амфипод с радиоактивно-меченными олигонуклеотидами HSE; C – *E. cyaneus*, Vr – *E. verrucosus*
K - контроль (6°C); 5' – гипертермия 25°C, 5 мин.; 30' – гипертермия 25°C, 30 мин.

После 5 минут острого температурного воздействия (25°C) у этого вида отмечали увеличение содержания HSF-HSE комплексов, которые оставались в стабильно-связанном состоянии после 30 минут экспозиции. У *E. verrucosus* комплексов HSF-HSE в контроле не отмечали. После 5 минут воздействия гипертермии фиксировали наличие слабовыраженных комплексов, которые исчезали после 30 минут эксперимента (рис. 1).

При анализе суммарной экспрессии обоих детектированных генов *bmi70* методом ПЦР в реальном времени выявляли повышение экспрессии в ответ на острое температурное воздействие. У термочувствительного *E. verrucosus* отмечали повышение экспрессии на час и шесть часов экспозиции с последующим снижением до контрольного значения, тогда как у термоустойчивого *E. cyaneus* острое температурное воздействие вызывало постепенное повышение экспрессии *bmi70* с максимальным повышением к 24 часам экспозиции (рис. 2).

Анализ накопления БТШ70 методом Вестерн-блоттинга с антителами к БТШ70 при остром температурном воздействии и последующего восстановления показал, что у обоих видов происходит повышение содержания БТШ70, однако базовый уровень и степень повышения различаются между видами.

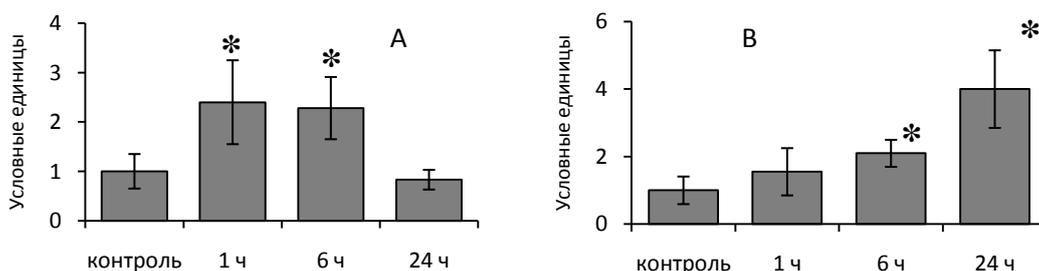


Рис. 2. Относительная экспрессия *bmi70* у амфипод при остром температурном воздействии (25°C); А – *E. verrucosus*, В – *E. cyaneus*. Относительная экспрессия нормализована по уровню экспрессии β-актина
* - достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$ ($n = 5$).

Так у термоустойчивого *E. cyaneus* базовый уровень БТШ70 в пять раз выше, чем у термочувствительного *E. verrucosus*, при этом степень повышения от контроля у последнего вида выше (рис. 3, А). При постепенном повышении температуры отмечали слабовыраженную реакцию повышения уровня БТШ70 у обоих видов, при этом у термочувствительного *E. verrucosus* достоверное повышение фиксировали уже на 13°C, тогда как у термоустойчивого *E. cyaneus* уровень БТШ70 достоверно повышался лишь на 29°C экспозиции (рис. 3, В).

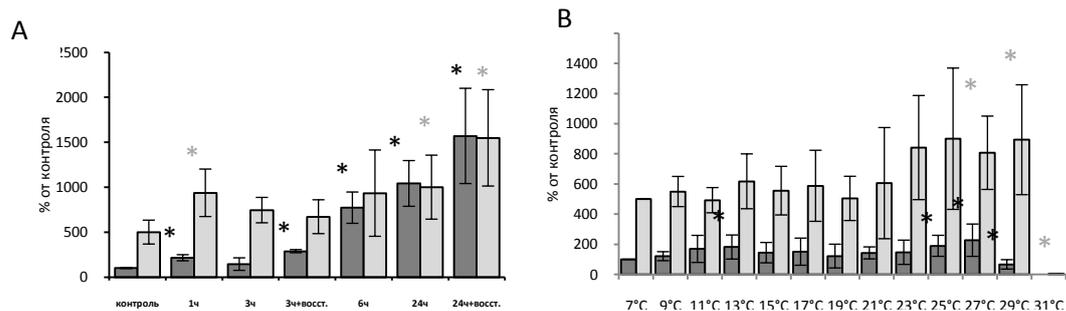


Рис. 3. Изменение содержания БТШ70 у амфипод при воздействии повышенной температуры: А. Тепловой шок (25 °С) и последующее восстановление (7°С). В. Постепенное повышение температуры со скоростью 1°С в час. Результаты денситометрического анализа, выраженные в % от контроля. темные столбцы – *E. verrucosus*, светлые столбцы – *E. cyaneus*
* - достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$ ($n = 5$)

Таким образом, в ходе исследования выявлен комплекс структурно-функциональных особенностей механизма экспрессии и синтеза БТШ70, связанных с терморезистентными способностями вида на примере эндемичных байкальских амфипод. Показано, что более термотолерантный вид содержит больше копий *btsh70* в геноме и изоформ БТШ70 в протеоме, а также более компактные регуляторные области генов *btsh70*. Показана различная регуляция транскрипции генов *btsh70* у изученных видов и снижение экспрессии *btsh70* у менее термотолерантного вида при 24 часах острого температурного воздействия, что может свидетельствовать о низкой температурной устойчивости транскриптов *btsh70* у этого вида. При температурном воздействии отмечали меньшую степень повышения содержания БТШ70 и более высокий базовый уровень, а также большую температуру активации повышения содержания БТШ70 у более термотолерантного вида.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 09-04-00398-а, 10-04-00611-а, 10-04-92505-ИК а, 11-04-91321-SIG а, 11-04-00174-а, 12-04-00810-а, грантов ФЦП «Кадры» (РОСОБРАЗОВАНИЕ); Грантов Президента РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейнберг И.В., Камалтынов Р.М. Сообщества макрозообентоса каменистого пляжа озера Байкал // Зоологический журнал. 1997. Т. 77. № 3. С.259 – 265.
2. Тахтеев В.В. Очерки о бокоплавах озера Байкал (систематика, сравнительная экология, эволюция). Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 2000. 355 с.
3. Тимофеев М.А. Кириченко К.А. Экспериментальная оценка роли абиотических факторов в ограничении распространения эндемиков за пределы озера Байкал на примере амфипод // Сиб. экол. журн. 2004. № 1. С. 41–50.
4. Тимофеев М.А. Экологические и физиологические аспекты адаптации к абиотическим факторам среды эндемичных байкальских и палеарктических амфипод: автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 2011. 384 с.
5. Evgen'ev M.B., Garbuz D.G., Zatssepina O.G. Heat Shock Proteins: Functions and Role in Adaptation to Hyperthermia // Russian Journal of Developmental Biology. 2005. Vol. 36. No. 4. P. 218–224.
6. Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology // Annual Review of Physiology. 1999. V. 61. P. 243-282.
7. Organization and evolution of *hsp70* clusters strikingly differ in two species of stratiomyidae (Diptera) inhabiting thermally contrasting environments / D. Garbuz, I. Yushenova, O. Zatssepina et al. / BMC Evolutionary Biology. 2011. V. 11 (1). P. 74-91.
8. Kozhova O.M., Izmeteva L.R. 1998. Lake Baikal: Evolution and Biodiversity. The Netherlands: Backhuys Publishers. Leiden, 1998. 447 p.
9. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation/ O. G. Zatssepina, K. A. Ulmasov, S. F. Beresten et al.// J. Exp. Biol. 2000. V. 203. I.6. P. 1017 25.

MOLECULAR MECHANISMS OF HSP70 EXPRESSION AND SYNTHESIS IN TWO BAIKAL AMPHIPODS WITH CONTRAST THERMORESISTANT ABILITIES

Bedulina D.S., Zatsepina O.G., Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Garbuz D.G., Shatilina Z.M., Axenov-Gribanov D.V., Gurkov A. N., Vereshagina K.P., Kondrat'eva E.M., Timofeyev M.A., Evgen'ev M. B.

In two congener endemic amphipods from Lake Baikal the functional and structural species-specific differences in the *hsp70* –response molecular mechanisms were described and the role of showed differences in the thermotolerance development was shown. It was first time coding and flanking areas of *hsp70* members for endemic Baikal animals cloned and sequenced. Higher number of *hsp70* genes and isoforms of HSP70 in more thermal tolerant species was detected. The species-specific differences in expression regulation as well as in the thermal-induced *hsp70*-expression and HSP70 accumulation were shown. The observed differences explain the thermal tolerance development in *E. cyaneus* via the complex structural and functional rearrangements of *hsp70*-response molecular mechanism.

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ТЕРМОСТРЕССА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ СТЕРИЛЬНОЙ И ФЕРТИЛЬНОЙ ФОРМ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltiopsis flabelliformis*

Белоциценко Е.С.

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия
e-mail: belotsitsenko_es@mail.ru

В умеренных широтах одним из основных факторов, определяющих распространение, выживание и продуктивность морских макроводорослей, является температура (Lüning, 1990). Показано, что изменения температурного режима в местах обитания водорослей играют важную роль в регуляции метаболических и физиологических процессов макроводорослей на всех этапах онтогенеза.

Однако, наряду с регулирующим действием, колебания температурного режима способны вызывать повышенное образование активных форм кислорода (АФК), нередко ведущее к фотоокислительному стрессу (ФОС) и повреждениям растительных тканей, выраженных накоплением в тканях продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Lesser, 2006). В экспериментах на микро- и макроводорослях показано, что процесс адаптации растений к неблагоприятным условиям среды, в том числе и к повышению температуры воды, происходит при активном участии антиоксидантной системы (АОС), контролирующей в клетках уровень продукции АФК. Эффективность функционирования АОС определяется состоянием общего антиоксидантного потенциала, который во многом обусловлен активностью антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), аскорбатпероксидаза (АПО), и содержанием низкомолекулярных антиоксидантов, например, аскорбата (АСК) (Lesser, 2006).

Однако, до недавнего времени исследования природы антиоксидантной защиты макроводорослей, обитающих на мелководье были в основном сконцентрированы на реакциях, вызванных воздействием высоких интенсивностей видимого и/или УФ света (Aguilera et al., 2002 и др.) и совсем незначительное количество работ было посвящено изучению влияния температуры на физиологию водорослей с точки зрения продуцирования АФК и антиоксидантного ответа растений (Collen, Davison, 2001; Choo et al., 2004). Более того, сведения о стратегии антиоксидантной защиты морских макроводорослей в онтогенезе ограничены небольшим количеством работ, посвященных исследованию активности АОС на ранних стадиях развития (Liu, Pang, 2009). Поэтому целью данной работы было исследование динамики активности АОС стерильной и фертильной форм морской красной водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* при действии кратковременного повышения температуры воды до 26°C в контролируемых лабораторных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была прикрепленная форма морской красной водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Harv.) Masuda, обитающей на литорали и верхней сублиторали

Японского моря. Стерильную и фертильную форму водоросли собирали из естественных мест обитания в Амурском заливе, м. Красный на глубине 0.5-0.7 м в августе 2011 г. Репродуктивную стадию водоросли определяли по наличию цистокарпа на гистологических срезах, выполненных от руки с помощью лезвия в средней части ветвей последнего порядка.

Талломы водорослей очищали от эпифитов и помещали в сосуды ($V=4$ л) с фильтрованной морской водой с добавлением среды PES. Сосуды переносили в две термостатируемые камеры, в которых поддерживалась постоянная температура $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), соответствующая таковой в месте сбора объектов. Камеры освещали флуоресцентными лампами белого света ('Osram-L' 65W/2SS, Германия). Освещенность (насыщающая, но не ингибирующая фотосинтетические процессы водорослей) составляла $200\text{ мкЕ/м}^2\text{ сек}$, фотопериод 12 ч света: 12 ч темноты. В этих условиях водоросли находились при постоянной аэрации в течение 3 суток с целью преадаптации к условиям эксперимента. Воду меняли каждый день.

По окончании периода преадаптации в одной из термостатируемых камер с объектами постепенно, в течение 1 ч, повышали температуру воды до $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), что соответствовало максимальному прогреву воды в природе, типичным солнечным днем на мелководье Амурского залива. Таким образом, экспериментальные варианты были разделены на 4 группы: контрольные – стерильные водоросли ($T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$) и фертильные водоросли ($T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$); экспериментальные – стерильные водоросли ($T=26\text{ }^{\circ}\text{C}$) и фертильные водоросли ($T=26\text{ }^{\circ}\text{C}$). Длительность эксперимента составляла 24 ч (с 8:00 до 8:00). Пробы отбирали до начала экспозиции и через 1, 3, 6, 12 и 24 часа экспозиции во всех 4-х группах опыта. Отобранные пробы взвешивали, фиксировали в жидком азоте и хранили при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего анализа активности антиоксидантных ферментов и содержания аскорбата.

Активность СОД, КАТ, АПО и содержания АСК определяли стандартными методами спектрофотометрии, как описано у Агилера с соавт. (Aguilera et al., 2002). Активность СОД, КАТ и АПО выражали в относительных единицах, содержание АСК в мкмоль. В качестве базы для полученных результатов был принят сырой вес биомассы водорослей или содержание белка. Белок определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Все процедуры по выделению ферментов и аскорбата проводили при $2 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, по определению активности и содержанию этих компонентов АОС – при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Все анализы проводили в четырехкратной биологической повторности. Для оценки статистических различий между опытными вариантами полученные данные подвергали анализу ANOVA с последующим использованием Tukey HSD-теста. Представленные значения соответствуют средним и их стандартным отклонениям (SD); различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены сравнительные характеристики антиоксидантного статуса *A. flabelliformis* на разных стадиях онтогенеза. Достоверных различий ($P > 0.05$) в активности супероксиддисмутазы (СОД) между стерильной и фертильной формой обнаружено не было (табл. 1). Активность КАТ, АПО и содержание АСК были в 1.5-2 раза выше ($P < 0.05$) в талломах стерильных растений (табл. 1). Эксперименты, проведенные ранее на бурой водоросли *Saccharina japonica*, напротив, показали, что активность СОД, КАТ и АПО в спороносящих тканях в 2 – 2.5 раза превышала таковую в смежных неспороносящих частях таллома (Mizuta, Yasui, 2010). Вероятно, подобные различия между литературными и полученными в данной работе результатами могут объясняться различной таксономической принадлежностью водорослей. Обнаруженные нами более низкое содержание АСК и пониженная активность КАТ и АПО, ответственных за детоксикацию H_2O_2 , у фертильной формы *A. flabelliformis* могут быть связаны как с замедлением скорости метаболических процессов и синтеза белков *de novo* в талломах водоросли на стадии репродукции, так и с повреждением необходимых для биосинтеза белков молекул продуктами ПОЛ, накапливающимися в течение вегетационного периода (Чиркова, 2002).

При экспонировании водорослей в условиях кратковременного повышения температуры воды было установлено, что термостресс оказывал значительное влияние на активность СОД, КАТ и АПО. Следует отметить, что достоверных ($P > 0.05$) изменений в активности этих ферментов, а также содержания АСК в талломах контрольных растений ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение

эксперимента зарегистрировано не было (рис. 1). Достоверное ($P<0.05$) увеличение активности СОД у стерильной формы *A. flabelliformis* было отмечено через 6 ч термостресса (рис. 1), а у стерильной формы *A. flabelliformis* – через 3 и 6 ч действия повышенной температуры воды (рис. 1). Однако, через 12 ч термостресса в талломах фертильной формы *A. flabelliformis* было зарегистрировано достоверное ($P<0.05$) снижение активности этого фермента, аналогичное отмеченному ранее у зеленой макроводоросли *Cladophora glomerata* при кратковременном повышении температуры воды (Choo et al., 2004). По мнению ряда авторов (Collen, Davison, 2001; Choo et al., 2004 и др.) подобная потеря активности СОД может быть следствием снижения количества белка в тканях водоросли при действии повышенной температуры воды. Следует отметить, что в период снижения стрессовой нагрузки (через 24 ч экспозиции) активность СОД соответствовала контрольным значениям в талломах обеих форм *A. flabelliformis* (рис. 1).

Таблица 1. Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), аскорбатпероксидазы (АПО) и содержание аскорбата (АСК) в тканях стерильной и фертильной форм *A. flabelliformis*.

| | СОД | КАТ | АПО | АСК |
|------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| стерильная форма | 19.23 ^a | 78.23^a | 0.81^a | 2.39^a |
| фертильная форма | 17.51 ^a | 59.37 ^b | 0.35 ^b | 1.06 ^b |

Примечание. В таблице представлены средне-арифметические значения, при $n = 8$. Разными буквами показана достоверность различий между формами, при $P<0.05$. Активность ферментов выражена в Отн. Ед/(мг белка). 1 единица = мкмоль субстрата, израсходованного за 1 мин; содержание АСК выражено в мкмоль/(г сыр. веса).

Увеличение ($P<0.05$) активности КАТ в тканях было отмечено у обеих форм *A. flabelliformis* через 3 ч экспозиции (рис. 1), однако в талломах фертильной формы высокая активность этого фермента была зарегистрирована также через 6 ч термостресса (рис. 1). Через 24 ч экспозиции активность КАТ соответствовала уровню контрольных значений только у стерильной формы *A. flabelliformis*; у фертильной формы было отмечено незначительное увеличение активности этого фермента относительно контрольных значений (рис. 1). Обнаруженное нами сохранение высокой активности КАТ в талломах фертильной формы *A. flabelliformis* в этот период времени может косвенно свидетельствовать об интенсификации окислительных процессов в пероксисомах водоросли (Asada, 1992).

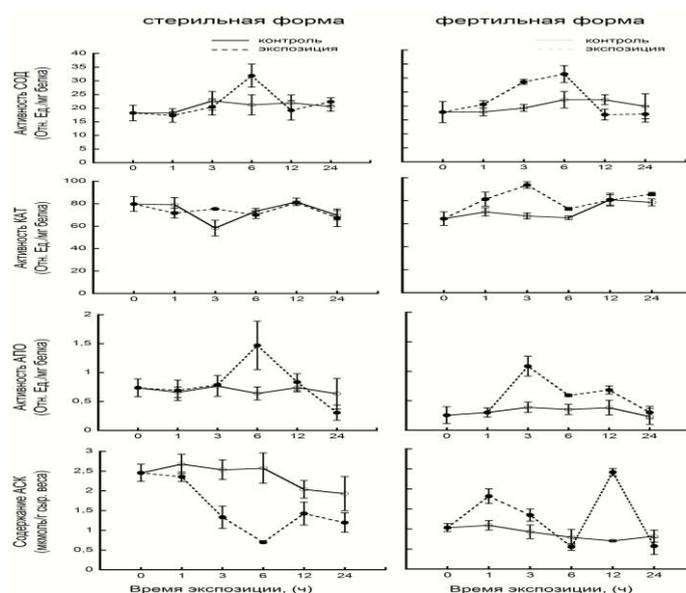


Рис. 1. Влияние кратковременного термостресса (26°C) на активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, (СОД), каталазы, (КАТ), аскорбатпероксидазы, (АПО) и содержание аскорбата (АСК) в тканях стерильной и фертильной форм *A. flabelliformis*. Представлены средне-арифметические значения \pm SD, $n = 4$.

В течение эксперимента увеличение ($P<0.05$) активности АПО было зарегистрировано в талломах стерильной формы *A. flabelliformis* через 6 ч термостресса, а в талломах фертильной формы – через 3, 6 и 12 ч экспозиции (рис. 1). Следует отметить, что активность этого фермента у фертильных растений через 6 и 12 ч термостресса была, по крайней мере, в 2 раза ниже таковой в 3-ч варианте опыта (рис. 1). Подобное снижение активности АПО, принимающей активное участие в восстановлении АСК, у фертильной формы водоросли может косвенно указывать на снижение скорости процессов ресинтеза АСК в талломах водоросли через 3 ч термостресса (Asada, 1992). Следует также отметить, что задержка в активации СОД и АПО в талломах стерильной формы *A. flabelliformis* при кратковременном повышении температуры воды может быть обусловлена изначально более высокой активностью этих компонентов АОС в тканях водоросли на данной стадии онтогенеза (табл. 1).

Анализ содержания АСК в тканях *A. flabelliformis* показал, что в талломах стерильных растений происходило достоверное ($P<0.05$) снижение его содержания (рис. 1). Данное уменьшение содержания АСК в талломах стерильной формы водоросли может быть обусловлено недостаточной скоростью ресинтеза этого антиоксиданта на фоне неизменной активности АПО в первые 3 ч термостресса (рис. 1), приводя, таким образом, к истощению пула АСК (Asada, 1992). Увеличение ($P<0.05$) содержания АСК в тканях фертильной формы *A. flabelliformis* было отмечено через 1, 3 и 12 ч экспозиции (рис. 1). Следует отметить, что увеличение его содержания через 1 ч термостресса в тканях фертильной формы водоросли на фоне отсутствия изменений в активности АПО в этот период времени может свидетельствовать об увеличении концентрации этого антиоксиданта за счет синтеза *de novo*, а не активного восстановления окисленной формы АСК (Asada, 1992).

В целом реакция антиоксидантной системы *A. flabelliformis* на кратковременный термостресс неоднозначна и зависит от стадии онтогенеза макроводоросли. АОС фертильных растений реагирует на стресс быстрее, чем таковая стерильных особей, по-видимому, вследствие пониженного антиоксидантного потенциала спороносящей ткани. Однако, индукция активности СОД, КАТ, АПО у *A. flabelliformis* в ответ на действие термостресса носит единовременный характер вне зависимости от стадии онтогенеза растений, что свидетельствует о важной роли этих ферментов в защите клеток красных водорослей при резком повышении температуры воды до субоптимальных значений. Причем, наибольшую активность проявляет АПО - фермент, нейтрализующий в растительных клетках перекись водорода (H_2O_2). Это, наряду со значительными изменениями в содержании АСК, указывает на активную генерацию H_2O_2 в условиях высокотемпературного стресса.

Работа выполнена при поддержке грантов ДВО № 12-III-B-06-048 и РФФИ № 12-04-01424-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб., 2002. 244 с.
2. Aguilera J, Dummermuth A.L., Karsten U, Schriek R., Wiencke C, Enzymatic defense against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae// Polar. Biol. 2002. V. 25. P. 432-441.
3. Asada K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants// Physiol. Plant. 1992. V. 85. P. 235–241.
4. Bradford E. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding// Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
5. Choo K., Snoeijs P., Pedersen M. J. Oxidative stress tolerance in the filamentous alga *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*// J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2004. V. 298. P. 111-123.
6. Collen J, Davison I.R. Seasonality and stress acclimation of reactive oxygen metabolism in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae)// J. Phycol. 2001. V. 37. P. 474-481.
7. Lesser M.P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology// Ann. Rev. Physiol. 2006. V. 68. P. 253-278.
8. Liu F., Pang S. J. Performances of growth, photochemical efficiency, and stress tolerance of young sporophytes from seven population of *Saccharina japonica* (Phaeophyta) under short-term heat stress// J. Appl. Phycol. 2009. P. 221 – 229.
9. Lüning K. Seaweeds. Their environment, biogeography and ecophysiology. New York.: John Wiley & Sons, 1990. 527 pp.
10. Mizuta H., Yasui H. Significance of radical oxygen production in sorus development and zoospore germination in *Saccharina japonica* (Phaeophyceae)// Botanica Marina. 2010. V. 53. P. 409-416.

EFFECT OF SHORT-TERM THERMAL STRESS ON ANTIOXIDANT SYSTEM OF STERILE AND FERTILE FORMS OF THE RED SEAWEED *AHNFELTIOPSIS FLABELLIFORMIS*

E.S. Belotsitsenko

Institute of Marine Biology FEBRAS, Vladivostok, Russia

The effects of short-term (24 h) thermal stress (26°C, i.e. +4°C above control) on the dynamics of activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT, and ascorbate peroxidase, APX) and the ascorbate (AsA) content in the sterile and fertile forms of *Ahnfeltiopsis flabelliformis* ((Harv.) Masuda) were investigated. Both algal forms showed a pronounced increase in the activity of all enzymes investigated, with a maximum induction of APX, under stress exposure. An increase in the AsA content during stress exposure was observed only in the fertile form, while in the sterile form it was decreased. However, after decreasing of stress load (24 h) SOD, APX activities and ASC concentration were similar to the control in both forms of *A. flabelliformis*, while CAT activity increased negligible as compared with the control solely in fertile form. Thus the antioxidant enzymatic metabolism of both the sterile and fertile forms of *A. flabelliformis* appeared to be tolerant to short-term impact of temperature as high as 26°C. **Key words:** *Ahnfeltiopsis flabelliformis* – Ontogenesis – Temperature stress – SOD - CAT - APX – AsA.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КАК МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ И АДАПТАЦИИ К ПРИРОДНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Н. Л. Белькова^{1,2}, Е. В. Суханова¹, Е. Б. Матюгина³, О. П. Дагурова⁴

1 – Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

2 – Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

3 – Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита, Россия

4 – Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

e-mail: nlbelkova@gmail.com

Широкое использование высокопроизводительных методов молекулярной биологии в микробной экологии существенно меняет наше представление о разнообразии микроорганизмов. В частности, существенно изменилось наше понимание дифференциации микроорганизмов на популяционном уровне, включая экологические адаптации, ведущие к дивергенции и видообразованию. Несмотря на то, что определены многие процессы, лежащие в основе дифференциации, оценка относительной значимости этих процессов в естественных местах обитания остается нетривиальной задачей. Один из основных нерешенных вопросов заключается в том, насколько наблюдаемая генетическая гетерогенность микробных сообществ обусловлена адаптивными процессами, происходящими в природных экосистемах. Сопоставление метагеномных и функциональных данных, полученных с помощью траскриптомов, протеомов и метаболомов, позволит определить конкретные молекулярные механизмы, выполняемые конкретными группами микроорганизмов, которые должны быть обеспечены определением видов микроорганизмов. Очевидно, что такая система молекулярной организменной классификации, основанная на трех китах теоретических исследований: экологии, генетике и эволюции, может быть универсально применима к микробным сообществам.

Метагеномные исследования, основанные на анализе нуклеотидных последовательностей, позволяют достаточно полно охарактеризовать состав и структуру бактериальных сообществ. В настоящее время можно выделить несколько направлений молекулярно-генетических исследований, основанных на использовании праймеров и зондов разного уровня специфичности: 1) анализ генетического разнообразия по структурам рибосомных генов, в том числе пиросеквенирование ампликонов (Stahl et al., 1985, Huber et al., 2007 и др.); 2) подсчет численности филогенетических групп и отдельных представителей с использованием гибридизации *in situ* целых бактериальных клеток с помощью зондов на рибосомную РНК (Amann, 1995, Amann et al., 1997 и др.); 3) детекция и/или генетическая идентификация отдельных видов микроорганизмов в видо-специфичной амплификации, в том числе и ПЦР в реальном времени (Bradford et al., 1996, Парфенова и др., 2006 и др.).

Исследования проводили на различных типах микробных сообществ: глубинных вод озера Байкал, низкотемпературных родников на территории национального парка Алханай

(Забайкальский край) и высокогорных озер Восточных Саян (Республика Бурятия), микробных ассоциаций, развивающихся в бактериальных пленках в водоемах на границе раздела фаз вода-твердое вещество: на различных субстратах, экспонированных в литоральной зоне озера Байкал, бактериальных матах и поверхностных слоях донных отложений в пресных водоемах Восточной Сибири. Использовали комплекс молекулярно-генетических методов: общую структуру бактериальных сообществ исследовали в ПЦР с набором праймеров разного уровня специфичности, разнообразие доминирующих генотипов изучали с помощью клонирования ампликонов, полученных на консервативных бактериальных праймерах, развернутый состав микробных сообществ – пиросеквенированием ампликонов, полученных на бактериальных праймерах, гетеротрофную микрофлору культивировали на питательных средах с разным составом органических компонентов, идентификацию изолированных культур проводили секвенированием фрагмента гена малой субъединицы рибосомной РНК. Скорости микробных процессов (фотосинтез, темновая фиксация CO₂, метаногенез, сульфатредукция) определены радиоизотопным методом.

Центральным понятием в эволюции живого мира оказывается понятие устойчивого сообщества, под которым подразумевается сообщество, способное существовать неопределенно долго за счет поступающей извне энергии. Устойчивое сообщество не имеет внутренних причин для остановки своей деятельности, хотя оно и развивается и имеет сукцессию форм. Условием устойчивости сообщества является замкнутость циклов биогенных элементов. Таким образом, в каждом сообществе формируется трофическая сеть, представленная уравновешенными ветвями продуцентов и деструкторов. Требование материального и энергетического баланса допускает возможность теоретического анализа устойчивости сообщества. Вместе с тем такой подход составляет суть экологии и поэтому возникающее представление об эволюции можно назвать экологическим (Заварзин, 1993).

Сравнительный анализ последовательностей малой субъединицы рибосомной РНК выявил, что в пределах каждого прокариотического домена многочисленные глубоко ветвящиеся кластеры показывают огромное филогенетическое разнообразие, как архей, так и бактерий. Однако треть из более чем 30 филогенетических линий прокариот в основном содержит организмы, которые до сих пор не культивируются. Подобные кластеры, содержащие последовательности, полученные только молекулярными методами из различных пресноводных экосистем, нами получены и охарактеризованы при изучении генетического разнообразия микробных сообществ как холодноводных мест обитания глубинных вод озера Байкал и родников на территории национального парка Алханай, так и экологических ниш, характеризующихся мезотрофными условиями по температуре и составу питательных компонентов: бактериальных плёнок, поверхностных вод озер разного типа.

Групп-специфичной ПЦР выявлен широкий спектр таксономических групп микроорганизмов в природных микробных сообществах. Основные отличия наблюдаются в представленности фил цитофаги-флавобактерии, вирмикуты и актинобактерии, а также основных классов протеобактерий: альфа-, бета- и гамма-. В первую очередь обращает внимание отсутствие выраженных ампликонов такой крупной филы как вирмикуты в холодных водах озера Байкал, родниках национального парка Алханай и высокогорных озер. Эта закономерность, по-видимому, характерна для холодных и ультраолиготрофных вод. Грамположительные микроорганизмы с низким содержанием ГЦ пар, чаще всего образующие споры, являются повсеместно распространенной группой, а отсутствие специфичного ампликона в образцах суммарной ДНК, свидетельствует о низкой численности и представленности этой группы в исследованных местах обитания.

Исследования разнообразия микробных сообществ в бактериальных пленках показали, что во всех типах осадках и бактериальных матах (озеро Исток, Восточные Саяны) детектируются эубактерии, цианобактерии, бетапротеобактерии, цитофаги-флавобактерии и планктомицеты. Актинобактерии ассоциированы только с бактериальными матами, археи детектированы только в красно-коричневых матах, имеющих высокие концентрации гидроокислов железа, в то время как вирмикуты найдены в зеленых альгобактериальных матах. Отличительной особенностью этих сообществ является отсутствие ампликона на праймерах, специфичных к классу альфапротеобактерий. Эта группа микроорганизмов преимущественно представлена симбиотическими организмами или способными существовать в ассоциациях с

высшими растениями и животными. Отсутствие ее в образцах суммарной ДНК из осадков и бактериальных матов озера Исток может говорить о низкой численности микроорганизмов этой группы и быть связано как со специфическими условиями обитания, так и с доминированием определенных микроорганизмов-антагонистов.

Клонированием получено большое разнообразие доминирующих филотипов микроорганизмов, принадлежащих преимущественно филам Протеобактерии, Actinobacterii и Бактероидес, минорные формы представлены филами Верукомикробиа, Цианобактерии и Вирмикуты. ПЦР в реальном времени с групп-специфичными праймерами проведены количественные оценки отдельных классов Протеобактерий и Бактероидес и с использованием нового алгоритма в графическом виде представлены имеющиеся различия.

Пироквенированием ампликонов получены новые данные по составу микробных сообществ глубоководной зоны озера Байкал с глубин 25 и 600 м. Результаты подтвердили полученные данные по клонированию, но позволили оценить относительную представленность и структуру микробных сообществ.

Разнообразие культивируемых гетеротрофов получено на питательных средах с разным составом. Для изолирования использовали несколько методических подходов: метод фильтрации акклиматизации позволил определить виды, находящиеся в природных условиях в некультивируемом состоянии. Преимущественно это *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp. и *Agreia* sp. Показано, что уменьшение концентрации органических компонентов и добавление в состав питательных сред нетрадиционных компонентов и сигнальных молекул, уменьшение температуры инкубации и увеличение времени инкубации, позволяет культивировать новые бактериальные виды. Так, получены культуры Бетапротеобактерий: *Massilia* sp., *Janthinobacterium* sp., *Variovorax* sp., *Duganella* sp., Альфапротеобактерий: *Aurantimonas* sp., Actinobактерий: *Kocuria* sp., *Plantibacter* sp., *Actinotelluris* sp., *Dietzia* sp., *Agreia* sp. и большое разнообразие *Pedobacter* sp. (Бактероидес), которые ранее не были идентифицированы среди гетеротрофной микрофлоры пресных водоемов Восточной Сибири. Следует отметить, что фило типы некоторых представителей Протеобактерий (*Massilia* sp.) отмечены среди численно доминирующих форм, определенных методом пироквенированием ампликонов.

Проведено сопоставление функциональной активности сообществ по скоростям микробных процессов. Были измерены процессы продукции в воде высокогорных озер Восточных Саян. Темновая фиксация CO₂ составляла 0,05–2,39 мкг С/(дм³ сут), фотосинтез происходил со скоростью 0,03–9,28 мкг С/(дм³ сут). Во всех холодноводных озерах значения темновой фиксации углекислоты, являющейся показателем активности гетеротрофной составляющей микробного сообщества, превышали скорости фотосинтеза. В озере Перевальное, характеризующемся более высокой температурой воды (16°C), отмечена высокая интенсивность фотосинтеза, причем максимальные значения определены в придонной воде, что, по-видимому, связано с высокой прозрачностью озера и поступлением субстрата из осадков. В поверхностных осадках озер темновая фиксация CO₂ достигала 9,53 мкг С/(дм³ сут), фотосинтез – 44 мкг С/(дм³ сут), хемосинтез – 3,2 мкг С/(дм³ сут). В илах озера Черное вклад оксигенного фотосинтеза в продукцию отмечен наибольшим (81%), темновая ассимиляция CO₂ составляла 17%, доля аноксигенного фотосинтеза и хемосинтеза была незначительна. Скорости терминальных процессов сульфатредукции и метаногенеза в осадках озер Черное и Изумрудное регистрировали на уровне значений, определенных для глубоководных байкальских осадков. В органическом илу озера Перевальное интенсивности обоих процессов были выше на 1–2 порядка величин. На конечных этапах анаэробной деструкции во всех озерах распад органического вещества в основном завершался процессом метаногенеза.

Сравнительные исследования, характеризующие микробные сообщества нескольких пресноводных экосистем, показывают достаточно большие различия в биоразнообразии (Yannarell, Triplett, 2005 и др.). Исследователи приводят доказательства того, что некоторые бактериальные группы являются специфичными для пресноводных экосистем (Logares et al., 2010 и др.), но в пределах основных фил бактерий есть группы, имеющие глобальное распространение (Zwart et al., 2002 и др.). Эта явная оппозиция двух точек зрения на биоразнообразие, обозначенных как «каждое озеро имеет отличное от других микробное сообщество» и «много озер имеют одинаковые бактериальные таксоны», возникла из-за

исключительно описательных по природе, предлагающих не более, чем список видов для множества различных пресноводных экосистем или пресловутое «собрание клонов», молекулярных методов, используемых для определения бактериальных таксонов в пресноводных озерах. Этот описательный подход является необходимой первой стадией в прогрессе любой естественной науки, но он не может снабдить нас способностью предвидеть, необходимой для создания синтетического понимания экологии пресноводных микробных сообществ. Для эффективного дальнейшего развития, необходимо сформировать структуру, каркас, в рамках которого определить распределение таксонов или филоотипов, основанное на процессе или механизме.

Работа выполнена в рамках ГК № 16.512.11.2130 Министерства образования и науки Российской Федерации и бюджетной темы «Особенности формирования и жизненная стратегия микробного сообщества и вирусов в биопленках в оз. Байкал».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин Г.А. Развитие микробных сообществ в истории Земли. // В кн. Проблемы доантропогенной эволюции биосферы. М.: Наука, 1993. С. 212-222.
2. Парфенова В.В., Белькова Н.Л., Денисова Л.Я., Зайчиков Е.Ф., Максименко С.Ю., Захарова Ю.Р., Поддубняк Н.Ю., Моложавая О.А., Никулина И.Г. Изучение видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Байкал // Биология внутренних вод, 2006. № 1. С. 8-15.
3. Amann R., Glockner F.O., Neef A. Modern methods in subsurface Microbiology – *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes // FEMS Microbiol. Rev., 1997. Vol. 20. P. 191-200.
4. Amann R.I. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology // Mol. Ecol., 1995. Vol. 4. P. 543-554.
5. Bradford D., Hugenholtz P., Seviour E.M., Cunningham M.A., Stratton H., Seviour R.J., Blackall L.L. 16S rRNA analysis of isolates obtained from gram-negative, filamentous bacteria micromanipulated from activated sludge // Syst. Appl. Microbiol., 1996. Vol. 19. P. 334-343.
6. Huber J.A., Welch D.B.M., Morrison H.G., Huse S.M., Neal P.R., Butterfield D.A., Sogin M.L. Microbial population structures in the deep marine biosphere // Science, 2007. Vol. 318. P. 97-100.
7. Logares R., Brate J., Heinrich F., Shalchian-Tabrizi K., Bertilsson S. Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11) // Mol. Biol. Evol., 2010. Vol. 27. P. 347-357.
8. Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences // Appl. Environ. Microbiol., 1985. Vol. 49. P. 1379-1384.
9. Yannarell A.C., Triplett E.W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition // Appl. Environ. Microbiol., 2005. Vol. 71. P. 227-239.
10. Zwart G., Crump B.C., Agterveld M.P.K.V., Hagen F., Han S.K. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers // Aquat. Microb. Ecol., 2002. Vol. 28. P. 141-155.

BIODIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES AS MECHANISM OF STABILITY AND ADAPTATION TO NATURAL ENVIRONMENTAL FACTORS

N. L. Belkova, E. B. Matyugina, O. P. Dagurova

Results on molecular analysis of natural microbial communities with variety methods as group-specific PCR, molecular cloning and pyrosequencing were summarized. Comparative analysis of different low temperature freshwater microbial communities as deep baikalian waters, seeps at Alkhanay National Park and high mountain lakes of Sayan Mountain as well as biofilm on solid surfaces was done.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОРСКОЙ ЛИЛИИ *HIMEROMETRA ROBUSTIPINNA* ПОСЛЕ АУТОТОМИИ

Н.В. Бобровская¹, И.Ю. Долматов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
e-mail: loriel@list.ru

Живые организмы постоянно подвергаются повреждающему действию различных абиотических и биотических факторов. В процессе эволюции у животных сформировались различные адаптации, позволяющие снизить негативное воздействие окружающей среды. Одними из таких адаптаций являются аутоотомия и сопутствующая ей регенерация. Аутоотомия – это процесс отбрасывания частей тела животного, который служит защитной реакцией в ответ на внешние раздражители (Wilkie, 2001). Отделение придатка происходит в строго определенном месте, в результате чего снижаются кровопотери и риск инфицирования микроорганизмами, а также облегчается эпителизация раны. У большинства животных аутоотомия сопровождается регенерацией, в результате чего утраченные структуры восстанавливаются.

Иглокожие представляют собой уникальную группу морских организмов для изучения аутоотомии и регенерации. Echinodermata – это достаточно древняя группа, время их появления датируется, вероятно, кембрийским периодом, поскольку уже в раннем ордовике имелось несколько классов этих животных, в частности ромбиферы и морские лилии (Ausich, Baumiller, 1993). Филогенетически иглокожие являются вторичноротыми животными и, соответственно, имеют общего предка с позвоночными. В настоящее время их объединяют с полухордовыми в группу Ambulacraria (Swalla, Smith, 2008). Их общий предок, очевидно, дал начало также и другим типам вторичноротых, Urochordata, Cephalochordata и Vertebrata. Иглокожие являются единственной группой животных, у которой наличие аутоотомии и регенерации установлено еще для палеозойских представителей. Палеонтологические данные свидетельствуют, что морские лилии уже в начале палеозоя обладали способностью отбрасывать дистальные части рук и регенерировать их (Baumiller, 2008).

Наиболее древними из ныне живущих иглокожих являются морские лилии. Современные Crinoidea способны отбрасывать и затем восстанавливать различные придатки – руки, цирри, пиннулы (Candia Carnevali, 2006) и всю чашечку вместе с внутренними органами (Amemiya, Oji, 1992). Факторами, вызывающими отторжение придатков, являются как нападение хищников, так и неблагоприятные условия обитания: шторма, загрязнение воды, недостаток питания и т.д. (Gahn, Baumiller, 2010). В настоящее время аутоотомия и регенерация рук у морских лилий хорошо изучены (Candia Carnevali, 2006). Кроме того, имеются данные о том, что эти животные способны отбрасывать внутренние органы, расположенные в чашечке (кишечник, аксиальный орган), а затем их быстро восстанавливать. Однако эти данные были получены более ста лет назад и достаточно фрагментарны (Dendy, 1886; Clark, 1921). Недавно при изучении морских лилий, обитающих в заливе Нячанг Южно-Китайского моря, нами были обнаружены виды, способные к аутоотомии внутренних органов. В этой связи была исследована морская лилия *Himerometra robustipinna* (Рис. 1).

У данного вида комплекс внутренних органов (висцеральная масса) состоит из спирально закрученного кишечника и аксиального органа. Она располагается в чашечке и заходит на основания рук. По периметру чашечки располагаются видоизмененные проксимальные пиннулы, которые прикрывают висцеральную массу и защищают ее от хищников. Аутоотомию внутренних органов *H. robustipinna* можно вызвать механическим воздействием. При захвате пинцетом висцеральной массы, через несколько секунд проксимальные пиннулы расходятся в стороны, раскрывая чашечку, и висцеральная масса свободно отделяется.



Рис. 1. Общий вид морской лилии *Himerometra robustipinna* (Crinoidea, Echinodermata).
р – чашечка, ч – рука, pp – проксимальный пиннулы

Регенерация аутоотомированных органов (Рис. 2А) у данного вида происходит быстро, в течение нескольких дней. Через сутки после аутоотомии формируется покровный эпидермис на оральной стороне чашечки и амбулакральные желобки. Амбулакральные желобки отрастают от неповрежденных частей в основании рук по направлению к центру чашечки. На вторые сутки после аутоотомии они объединяются в кольцо вокруг будущего рта (Рис. 2В). Последний представляет собой углубление в центре чашечки. В этот период пищеварительная система почти сформирована, но имеет меньшие по сравнению с нормой размеры.

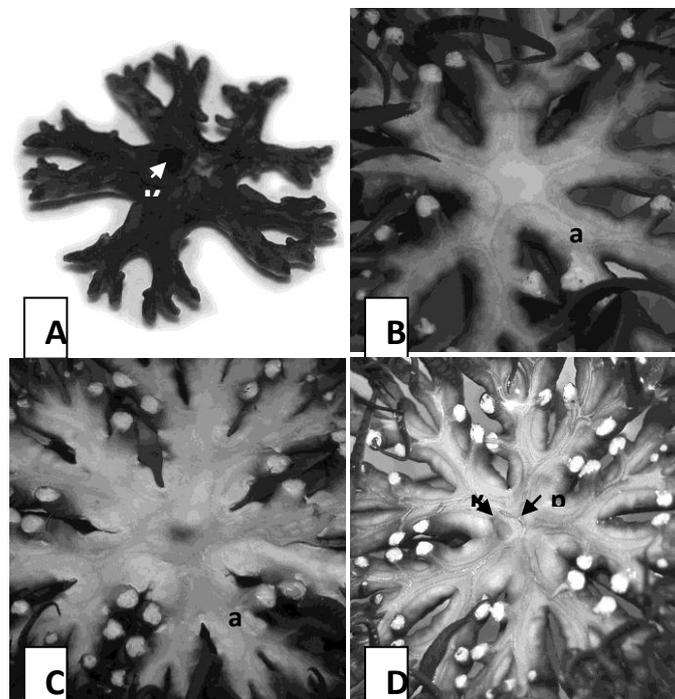


Рис. 2. А - общий вид аутоотомированных органов морской лилии *H. robustipinna*. к – клоака; В, С, D - общий вид оральной стороны чашечки морской лилии *H. robustipinna* на разных стадиях регенерации: В – 1 сут после аутоотомии, С – 2 сут после аутоотомии, D – 7 сут после аутоотомии. аж – амбулакральный желобок, к – клоака, рт – рот.

По данным трансмиссионной электронной микроскопии стенка пищеварительной системы на вторые сутки после аутоотомии представлена кишечным (Рис. 3А, 3В) и целомическим эпителиями, между которыми располагается слой бесструктурного внеклеточного матрикса, заполненного целомоцитами. Кишечный эпителий имеет толщину в среднем около 40 мкм, расположен на базальной мембране. Клетки его несут микроворсинки и хорошо развитые реснички, в апикальной части связаны между собой септированными межклеточными контактами. Некоторые энтероциты уже проявляют секреторную активность: в их апикальной цитоплазме видны небольшие секреторные вакуоли. На четвёртые сутки после аутоотомии формируется рот и анальное отверстие (Рис. 2С). Клоака в виде небольшого бугорка обнаруживается уже на пятые сутки после аутоотомии, а к седьмым суткам она хорошо заметна (Рис. 2D).

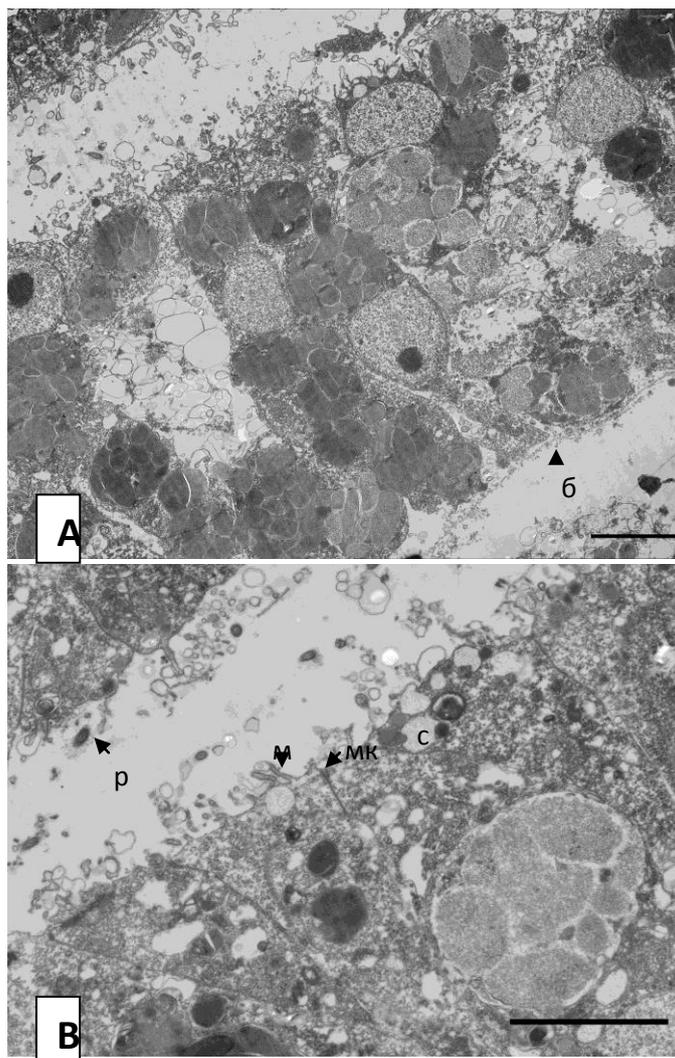


Рис. 3. Ультраструктура эпителия пищеварительной системы *N. robustipinna* на вторые сутки после аутоотомии. б – базальная мембрана, мв – микроворсинки, pc – поперечный срез реснички, mk – септированный межклеточный контакт, св – секреторная вакуоль. Масштаб 4 мкм.

Таким образом, исследованный нами вид морской лилии *N. robustipinna* обладает способностью аутоотомировать и в течение 5-7 суток полностью регенерировать пищеварительную систему.

Авторы выражают благодарность директору Института океанографии ВАНТ Буи Хон Лонгу и сотрудникам Департамента живых биоресурсов за возможность работать в ИО ВАНТ, а также Т.Н. Даутовой за помощь в работе. Работа выполнена при поддержке

грантов Правительства России (№ 11.G34.31.0010) и Российского фонда фундаментальных исследований и Президиума ДВО РАН (№11-04-98525).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amemiya S., Oji T. Regeneration in sea lilies// Nature. 1992. № 357. P.546–547.
2. Ausich W. I., Baumiller T. K. Column regeneration in an ordovician Crinoid (Echinodermata) – paleobiologic implications// Journal of Paleontology. 1993. № 67(6) P.1068–1070.
3. Baumiller T. K. Crinoid ecological morphology// Annual Review of Earth and Planetary Sciences. 2008. № 36. P.221–249.
4. Candia Carnevali M. D. Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning// Invertebrate Survival Journal. 2006. №3. P.64–76.
5. Clark A.H. A monograph of the existing crinoids. The comatulids. Part 1// Bul. US Natn. Mus. 1921. V. 82. P.389.
6. Dendy A. On the regeneration of the visceral mass in *Antedon rosaceus*// Stud. Biol. Labs. Owen Coll. 1886. V. 1. P. 299-312.
7. Gahn F.J., Baumiller T.K. Evolutionary history of regeneration in crinoids (Echinodermata)// Integr Comp Biol. 2010. №50. P. 1-13.
8. Swalla B. J., Smith A. B. Deciphering deuterostome phylogeny: molecular, morphological and palaeontological perspectives// Philosophical Transactions of the Royal Society. 2008. V. 363. P. 1557–1568.
9. Wilkie I.C. Autotomy as a prelude to regeneration in echinoderms// Microsc. Res. Tech. 2001. V. 55. P. 369-396.

REGENERATION OF THE DIGESTIVE SYSTEM IN THE CRINOID *HIMEROMETRA ROBUSTIPINNA* AFTER AUTOTOMY.

N.V.Bobrovskaya, I.Yu.Dolmatov

It was shown that crinoid *Himerometra robustipinna* had a capacity for autotomy of visceral mass. Autotomy occurs in reply to the capture of visceral mass by forceps. After several seconds of such treatment visceral mass separates from the calyx. Lost organs regenerate very fast. It starts by forming of integumental epidermis (tegument) and ambulacral grooves. Ambulacral grooves grow from the uninjured parts in the basis of each arm to the direction of the calyx center. On the second day after autotomy they form a ring circling the future mouth. The gut is already formed to that time. Its wall consists of luminal and coelomic epithelia with unstructured extracellular matrix between them, which is full of coelomocytes. The cells of the luminal epithelium have well developed intercellular junctions. Apical surface of enterocytes has a cilium. Some of the luminal epithelium cells show secretory activity. Their cytoplasm contains small secretory vacuoles. On the fourth days after autotomy oral and anal openings are formed. Tuberculate cloaca was detected five days after autotomy. Thus, we showed that *H. robustipinna* can autotomise and quickly recover internal organs. Regeneration takes only 5-7 days.

СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ УРОВНЯ ТРИЙОДТИРОНИНА У ТРЕХ ВИДОВ КАРПОВЫХ РЫБ ИЗ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА, БАССЕЙН ВОЛГИ.

А.А. Болотовский¹, Б.А. Лёвин^{1,2}

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок Ярославской области

²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

E-mail: bolot@ibiw.yaroslavl.ru

Гормоны щитовидной железы имеют важное значение в морфофизиологических адаптациях рыб к условиям окружающей среды. Известно, что от активности гипофизарно-тиреоидной оси зависит резистентность рыб к низким температурам (Hoar, Eales, 1963). Повышенный уровень тиреоидных гормонов обеспечивает успешную смолтификацию лососей, т.е. адаптацию молоди к обитанию в морской воде (Baggerman, 1962). Факторы окружающей среды в свою очередь могут регулировать различные звенья сигнальных каскадов, в которые вовлечены тиреоидные гормоны (Blanton, Specker, 2007). В природных популяциях у разных видов рыб концентрация трийодтиронина (Т₃ – активная форма тиреоидных гормонов) варьирует в очень широких пределах (от 0,2 нг/мл до 50 нг/мл) (Hulbert, 2000).

Для выяснения изменчивости уровня T_3 в сыворотке крови взрослых особей карповых рыб Европейской части России, где четко выражена сезонность, нами в течение года собраны и проанализированы пробы плотвы *Rutilus rutilus* (L.), леща *Abramis brama* (L.) и синца *Ballerus ballerus* (L.). Пробы крови у взрослых особей (по 4-6 особей в каждой выборке) отбирали каждый месяц (иногда реже). В мае пробы отбирали перед нерестом и непосредственно во время нереста. После выдерживания около часа (для образования сгустка) кровь центрифугировали (15 мин. при 5000 g) для отделения сыворотки. Количество общего T_3 в сыворотке измеряли методом иммуно-ферментного анализа с использованием коммерческих наборов Total Triiodothyronine (Monobind, США) с помощью микрострипового фотометра для иммуноферментного анализа Stat Fax 303 Plus (Awareness Technology, США). Всего обработано 40 половозрелых особей плотвы (TL 240-270 мм), 45 половозрелых особей леща (TL 380-400 мм) и 34 половозрелых особи синца (TL 270-300 мм).

В течение года концентрация общего T_3 в сыворотке крови исследованных видов рыб проявляет сходную динамику (рис. 1). Средний минимальный уровень гормона отмечен зимой и ранней весной (около 1 нг/мл и менее), после чего его содержание в сыворотке увеличивается и достигает пиковых значений 3,03 и 3,44 нг/мл (у плотвы и леща соответственно) в начале мая перед нерестом.

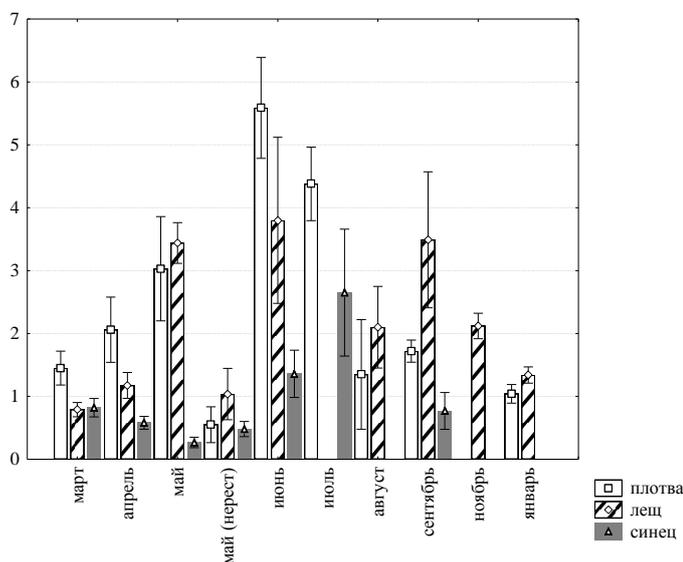


Рис. 1. Сезонная динамика уровня T_3 в сыворотке крови плотвы, леща и синца (представлены средние арифметические значения и стандартные ошибки средней).

При этом у синца уровень гормона значительно ниже, чем у плотвы и леща. Характерно, что у нерестующих особей концентрация T_3 значительно снижается (до 0,55 нг/мл у плотвы, 1,03 нг/мл у леща и 0,27 нг/мл у синца). В летние месяцы уровень T_3 возрастает и достигает максимальных в течение года значений - 5,59 нг/мл у плотвы, 3,80 нг/мл у леща и 2,65 нг/мл у синца. С наступлением осени уровень T_3 снижается и достигает минимальных значений к зиме. Размах индивидуальной изменчивости в течение года довольно велик: 0,25-8,10 нг/мл у плотвы, 0,25-7,75 нг/мл у леща и 0,05-5,70 нг/мл у синца.

Исследованные виды показывают разный уровень T_3 , но при этом проявляют сходную сезонную динамику.

Увеличение уровня T_3 весной в преднерестовый период может быть связано с интенсивным созреванием гонад. О прямой связи уровней тиреоидных и половых гормонов (эстрадиола и тестостерона) у костистых рыб сообщали ранее (Leatherland, 1985), к тому же некоторые гликопротеиновые гонадотропины имеют тиреотропную активность (Leatherland, 1982). В частности инъекции эстрадиола вызывали у канального сомика *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) существенное повышение уровней T_3 и тироксина – T_4 (MacKenzie et al., 1987). Отмечалось также, что секреция тиреоидных гормонов может стимулироваться повышенной активностью гипофизарно-гонадной оси, особенно на поздних стадиях созревания гонад, когда секреция гонадотропина наиболее высока (Leatherland, 1982). В целом,

тиреоидные гормоны могут вносить вклад в регуляцию инициирования стадий оогенеза у лососевых рыб (Cyr, Eales, 1996).

Наши данные показывают резкое падение уровня T_3 у нерестующих рыб. Наименьший уровень T_3 наблюдался и у нерестующих гольцов *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1814), однако снижение концентрации происходило в период созревания гонад (White, Henderson, 1977). Полученные результаты по сезонной динамике исследованных видов рыб Рыбинского вдхр. согласуются с литературными данными по лещу и другим видам рыб из Южной Франции (Bau, Parent, 2000). Например, для леща из южной Франции также характерны высокие уровни T_3 летом и в начале осени и их снижение зимой, а пределы варьирования по этому показателю сходны с таковыми для леща из Рыбинского вдхр. Однако, в исследовании Бау и Парена (Bau, Parent, 2000) отмечен лишь один пик уровня T_3 , тогда как по нашим результатам их два: первый преднерестовый с последующим падением во время нереста и второй летний. Летний максимум уровня T_3 объясняют высокими температурами, повышенной пищевой активностью и увеличенным уровнем анаболизма в летний период (Bau, Parent, 2000).

Исследования, выполненные на других видах, не столь однозначны. Так, активность щитовидной железы у форели *Salmo trutta* (L.) обнаруживает два пика весной и в середине лета. У радужной форели *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) максимумы зафиксированы также весной и в середине лета, а минимум – зимой (см. обзор у Leatherland, 1982). Сезонная бимодальность уровня T_3 отмечена у камбалы *Pleuronectes platessa* (L.) с пиками зимой и летом.

Таким образом, плотва, лещ и синец демонстрируют разные уровни трийодтиронина, сезонная динамика которых, тем не менее, проявляет сходную картину. Высокие концентрации T_3 отмечены весной, что обусловлено, по-видимому, созреванием гонад и подготовкой к нересту, и летом – в период повышенных температур и высокой пищевой активности.

Исследование поддержано грантами Президента РФ (МК-476.2012.4) и РФФИ (11-04-01252а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baggerman B. 1962. Some endocrine aspects of fish migration // Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. I. P. 188 – 205.
2. Bau F., Parent J.-P. 2000. Seasonal variations of thyroid hormone levels in wild fish // C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences. 323. P. 365 – 372.
3. Cyr D.G., Eales J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish // Rev. Fish Biol. Fish. 6. P. 165 – 200.
4. Blanton M.L., Specker J.L. 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction // Critical Reviews in Toxicology. 37. P. 97 – 115.
5. Hoar W.S., Eales J.G. 1963. The thyroid gland and low-temperature resistance of goldfish // Can. J. Zool. 41. P. 653 – 669.
6. Hulbert A. J. 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective // Biol. Rev. 75. P. 519 – 631.
7. Leatherland J.F. 1982. Environmental physiology of the teleostean thyroid gland: a review // Env. Biol. Fish. 7. P. 83 – 110.
8. Leatherland J.F. 1985. Effects of 17 β -estradiol and methyl testosterone on the activity of the thyroid gland in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson // Gen. Comp. Endocrinol. 60. P. 343 – 352.
9. MacKenzie D.S., Thomas P., Farrar S.M. 1989. Seasonal changes in thyroid and reproductive steroid hormones in female channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in pond culture // Aquaculture. 78. P. 63 – 80.
10. White B.A., Henderson N.E. 1977. Annual variations in the circulating levels of thyroid hormones in brook trout *Salvelinus fontinalis*, as measured by radioimmunoassay // Can. J. Zool. 55. P. 475 – 481.

SEASONAL VARIATION OF TRIIODOTHYRONINE LEVEL IN THREE SPECIES OF CYPRINID FISHES FROM RYBINSKOE RESERVOIR, VOLGA BASIN.

A.A. Bolotovskiy, B.A. Levin

Seasonal variations in plasma triiodothyronine (T_3) contents of the common roach *Rutilus rutilus* (L.), the bream *Abramis brama* (L.), and the blue bream *Ballerus ballerus* (L.) from Rybinskoe reservoir (Volga basin) were studied. Despite a level of total T_3 is species-specific, all species manifested the same seasonal dynamics of variation of total T_3 .

ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ НА ПРИМЕРЕ ФЕРМЕНТА ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ РЫБ

Борвинская Е.В., Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия,
e-mail: katsu@inbox.ru

В последнее время широкое распространение получил подход, при котором биохимические показатели (биомаркеры) используют для оценки здоровья организмов и качества среды их обитания (Немова, Высоцкая, 2004). Однако, применение этого метода существенно осложнено большой чувствительностью различных показателей метаболизма к факторам внутренней и внешней среды, таким как температура, pH, соленость, освещение и физиологический статус изучаемого объекта, обусловленный годовым циклом, полом, возрастом и т.д. (Ruus et al., 2002; Кореcka, Pempkowiak, 2008). Кроме того, в исследованиях *in situ*, как правило, нет возможности подобрать контроль идентичный опыту во всем, за исключением изучаемого воздействия, по причине значительной вариабельности и малого объема выборок.

Целью данной работы было использование активности тканевой глутатион S-трансферазы в качестве биомаркера для оценки состояния щуки (*Esox lucius L.*) из водоемов, подвергшихся загрязнению отходами горно-обогатительного комбината.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Особей щуки вылавливали в июне 2009 - 2011 гг. в озерах, расположенных на севере Республики Карелия. Озеро Костомукшское (хвостохранилище) используется Костомукшским горно-обогатительным комбинатом для сброса оборотных вод, используемых в технологическом цикле. Водоем отличается повышенной минерализацией воды (в 30 раз больше фоновой), в основном за счет ионов сульфатов, калия, лития, кальция и магния. В составе техногенных вод также присутствуют тяжелые металлы и мелкодисперсная минеральная взвесь. В качестве контроля использовали рыб из озера Каменное, расположенного на территории Костомукшского Государственного заповедника.

Определение активности GST в тканях рыб проводили по описанным методикам с использованием различных субстратов: 1-хлор-2,4-динитробензола (CDNB), 1,2-дихлор-4-нитробензола (DCNB), этакриновой кислоты (EtA), 4-нитрохинолин N-оксида (NNO), транс-4-фенил-3-бутен-2-она (tPB) и транс-стильбен оксида (tSO) (Habig et al., 1974; Stanley, Benson, 1988; Ivarsson et al., 2003).

Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 7 и Statgraphics Plus. Статистическую значимость различий оценивали по непараметрическому критерию (U) Манна - Уитни. Зависимость между исследуемыми параметрами выявляли с помощью корреляционно-регрессионного анализа. При этом учитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_s) и коэффициенты регрессии (Юнкер, Григорьев, 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение активности GST в органах самцов и самок щук выявило различия этого показателя в почках рыб (таб. 1). В 2009 и 2011 г. активность GST была в среднем в 3 раза выше у самок по сравнению с самцами. В 2010 г. в почках щук из оз. Каменное различий не было обнаружено, вероятно, из-за малого размера выборки ($n=3$), тогда как в оз. Костомукшское было выловлено только две особи самцов и анализ не проводили. Чтобы учесть влияние выявленной половой специфики, активность GST в почках самцов и самок щуки, выловленных из контрольного и опытного водоемов в разные годы, сравнивали отдельно.

В связи с тем, что в нашем эксперименте использовали рыб с большим диапазоном возрастов (2-14 лет), нами был проведен анализ влияния возрастных изменений на активность GST.

Показатели активности GST в печени, жабрах и почках щук заметно не изменялись по мере роста рыб, следовательно, в этих тканях при оценке зависимости активности GST от места вылова щук влияние этого фактора можно не учитывать.

Таблица 1. Активность GST в почках щуки в зависимости от пола рыб (ед. акт./мг белка)

| ГОД ВОДОЕМ | 2009 г. | | 2010 г. | | 2011 г. | |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | самки | самцы | самки | самцы | самки | самцы |
| оз. Каменное | 18 ± 7 | 10 ± 3 | 40 ± 13 | 39 ± 15 | 87 ± 5 | 36 ± 7* |
| оз. Костомукшское | 109 ± 9 | 34 ± 6* | 65 ± 9 | | 63 ± 15 | 10 ± 3* |

*-различия статистически значимы по сравнению с самками (p<0.05).

В свою очередь, в мышцах щук из оз. Каменное и оз. Костомукшское была выявлена статистически значимая положительная корреляция возраста и активности GST ($r_s = 0,60$ и $0,49$ соответственно). Сравнение активности в мышцах щук из оз. Каменное и оз. Костомукшское с учетом влияния возраста рыб может быть осуществлено с помощью регрессионного анализа (Рис. 1).

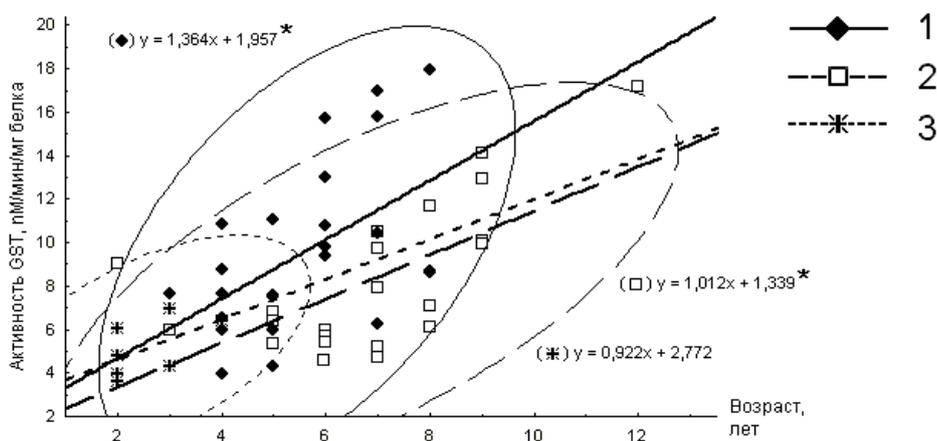


Рис. 1. Зависимость активности GST в мышцах щук от возраста рыб (данные за три года исследований). 1- оз. Каменное, 2- оз. Костомукшское, 3 - оз. Окуноевое.

* - уравнение регрессии статистически значимо при $p < 0,05$.

Уравнений простой линейной регрессии выражающей зависимость активности GST от возраста рыб имеет общий вид

$$y = kx + b$$

Угловой коэффициент k указывает насколько велик прирост активности за условную единицу возраста, тогда как по коэффициенту b можно судить об общем уровне активности GST. Сравнивая коэффициенты уравнений, полученных для рыб, выловленных из разных озер по формуле:

$$t = \frac{|M_1 + M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где M – среднеарифметическая коэффициента; m – ошибка среднеарифметической; t – критерий Стьюдента, можно сделать вывод о влиянии места вылова на величину активности фермента, а также на направление и выраженность зависимости активности от возраста.

Из рисунка 1 видно, что в мышцах щук старших возрастов активность GST несколько выше у рыб из оз. Костомукшское, чем у рыб из оз. Каменное. Тем не менее, анализ не выявил статистически значимых различий коэффициентов уравнений регрессии для рыб из разных озер (при уровне значимости $p < 0,05$). Можно сделать вывод, что антропогенный фактор либо не оказывает существенного воздействия на исследуемый показатель, либо кажущиеся различия находятся в пределах естественной вариабельности активности фермента.

В 2011 г. кроме 2 вышеперечисленных озер, отлов рыбы осуществляли также в оз. Окуноевое, расположенном по течению ниже хвостохранилища. При этом рыбы из этого озера

были в основном моложе (2-6 лет), чем рыбы из других исследованных озер (4-14 лет). Видно (рис. 1), что диапазон активности GST в мышцах щук из оз. Окунево хорошо укладывается в выявленную возрастную зависимость: у более молодых рыб активность GST ниже, чем у рыб из оз. Каменное и Костомукшское, где чаще попадались более старые особи. Нужно отметить, что при расчете параметров полученного уравнения регрессии для рыб из оз. Окунево, в связи с узким интервалом исследуемых возрастов, недостаточно варьировала и активность. Поэтому полученную зависимость следует рассматривать скорее как ориентировочную, чем достоверную. Тем не менее, можно сделать вывод о том, тенденция изменения активности в мышцах щук из оз. Окунево не отличается от таковой в контрольном водоеме, то есть условия обитания оз. Окунево не оказывают существенного влияния на исследуемый показатель.

Известно, что у большинства организмов присутствует целый набор изоформ глутатион S-трансфераз, которые по-разному реагируют на различные воздействия и могут применяться в качестве биомаркеров специфических видов загрязнения (Kim et al., 2009; Рйрез-Лыpez et al., 2002).

Для выявления ответа отдельных изоформ GST на антропогенное воздействие, в 2011 г. нами был использован метод определения активности GST в присутствии различных субстратов, более или менее специфичных для отдельных классов GST. Из пяти протестированных субстратов (NNO, DCNB, EtA, tSO и tPB), GST щук проявляют активность с двумя: NNO и DCNB. При этом активность с субстратом DCNB почках щук отличается очень большой вариабельностью, поэтому не использовалась в статистическом анализе.

Таблица 2. Активность GST с различными субстратами (нМ/мин/мг белка) в тканях щуки выловленной в 2011 г. из оз. Каменное (1) и оз. Костомукшское (2).

| Субстрат | жабры | | мышцы | | печень | | почки самки | | почки самцы | |
|----------|----------|------------|--------|--------|-----------|-----------|--------------------|--------|-------------------|--------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| CDNB | 444 ± 82 | 741 ± 110* | 10 ± 1 | 13 ± 3 | 742 ± 133 | 781 ± 155 | 87 ± 5 | 36 ± 7 | 63 ± 15 | 10 ± 3 |
| NNO | 23 ± 8 | 63 ± 18* | н.о. | н.о. | 40 ± 5 | 55 ± 9* | н.о. | | н.о. | |
| DCNB | н.о. | н.о. | н.о. | н.о. | н.о. | н.о. | $\frac{10'}{0-31}$ | | $\frac{4'}{0-89}$ | |

' - в числителе - медиана, в знаменателе – пределы колебаний.

* - различия статистически значимы по сравнению с рыбами из оз. Каменное (при p<0,05).

В жабрах щуки из оз. Костомукшское обнаружена индукция активности фермента с субстратами CDNB и NNO. Учитывая то, что между этими показателями наблюдается достоверная корреляция ($r_s = 0.81$) и то, что глутатион трансферазы обладают широкой и зачастую перекрывающейся субстратной специфичностью, эти результаты, вероятно, отражают активность одной изоформы GST, способной метаболизировать оба субстрата. В свою очередь, в печени щук была повышена активность GST в присутствии NNO, в то время как показатели активности в присутствии CDNB в этом органе не отличались от контроля. Это может означать, что в ответной реакции на изменение среды обитания участвуют не все, а только некоторые, более чувствительные изоформы фермента.

Таким образом, на примере глутатион S-трансферазы щук показано, что факторы внутренней среды, такие как пол и возраст, могут оказывать существенное влияние на показатели этого биомаркера, что усложняет интерпретацию получаемых результатов. Поэтому при проведении эколого-токсикологического мониторинга обязательным является применение адекватных методов статистической обработки данных, которые позволяют не только обнаружить и нивелировать влияние случайных факторов, но и помогают выявить некоторые общебиологические тенденции. Также показано, что чувствительность и специфичность таких биомаркеров как активность глутатион S-трансферазы можно повысить путем выявления отдельных изоформ, более чувствительных к воздействию загрязнений того или иного типа.

Работа выполнена при поддержке программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» на 2012–2014 гг.; гранта Президента РФ «Ведущие научные школы Российской Федерации» НШ 1642.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

2. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002. 266 с.
3. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. N 22. P. 7130-7139.
4. Ivarsson Y., Mackey A.J., Edalat M., Pearson W.R., Mannervik B. Identification of residues in glutathione transferase capable of driving functional diversification in evolution. A novel approach to protein redesign // The Journal of Biological Chemistry. 2003. Vol. 278. N 10. P. 8733–8738.
5. Kim J.-H., Raisuddin S., Rhee J.-S., Lee Y.-M., Han K.-N., Lee J.-S. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of a MAPEG superfamily gene from the pufferfish *Takifugu obscurus* // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2009. V. 149. P. 358–362.
6. Kopecka J., Pempkowiak J. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008. Vol.70. N 3. P.379-391.
7. Pírez-Lypez M., Nyvoa-Valicas M.C., Melgar-Riol M.J. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout // Toxicol. Lett. 20026. Vol. 136. N 2. P. 97-106.
8. Ruus A., Sandvik M., Ugland K.I., Skaare J.U. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web // Aquat. Toxicol. 2002. Vol. 61. N 1-2. P.73-87.
9. Stanley J. S., Benson A.M. The conjugation of 4-nitroquinoline 1-oxide, a potent carcinogen, by mammalian glutathione transferases // Biochem. J. 1988. Vol. 256. P. 303-306.

APPLICATION OF FISH GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY AS BIOMARKER IN ECO-TOXICOLOGICAL STUDIES.

Borvinskaya E.V., Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P.

The aim of this study was to investigate activity of the glutathione S-transferase in tissues of pike *Esox lucius* captured in a polluted site located near the mining factory which is the source of complex mixtures of industrial wastes. It was shown that pike's GST activity depends from fish age and sex. GST activity with substrate 4-nitroquinoline N-oxide was found to be significantly higher in liver and gills of pikes from polluted area, whereas GST activity with substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was elevated only in gills. This result reflects different response of GST isoforms to contamination and suggests that using set of substrates for the activity measurement is more sensitive method for pollution detection.

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ РЫБ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

О.Б. Васильева, М.А. Назарова, П.О. Рипатти, Н.Н. Немова

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия
e-mail: vasil@krc.karelia.ru*

В настоящее время деятельность человека является одним из наиболее значимых экологических факторов, приводящих к трансформации экосистем внутренних водоемов. В зависимости от характера и степени техногенного загрязнения, реакция гидробионтов может варьировать от неспецифического ответа, носящего адаптивный характер, до патологических изменений, возможно, необратимых, вплоть до гибели организма. Поэтому, как никогда актуальной становится проблема выбора наиболее информативных биологических критериев оценки состояния рыб, объективно отражающих уровень техногенной нагрузки на водные экосистемы. Известно, что эколого-биохимическое тестирование является одним из наиболее универсальных инструментов для исследования механизмов развития приспособительных реакций у рыб в ответ на токсическое воздействие (Немова, Высоцкая, 2004).

Среди широкого спектра биохимических параметров, используемых в качестве биоиндикаторов, следует выделить липидные показатели, которые благодаря своей гетерогенности, играют важную роль в развитии адаптивного ответа у рыб при антропогенном воздействии. Общие липиды (ОЛ), в зависимости от выполняемых ими функций, можно

подразделить на запасные и структурные. К запасным липидам относятся триацилглицерины (ТАГ) – энергетические субстраты клетки, накопление или снижение содержания которых, в первую очередь, зависит от интенсивности аэробных процессов. Фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА), а также холестерин (ХС) являются основными компонентами биологических мембран и играют не только структурообразующую роль, но и влияют на жидкость бислоя, тем самым определяя функциональную активность многих мембрансвязанных ферментов. Минорные фосфолипиды, такие как фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилсерин (ФС) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ) относятся к биоэффекторам и выполняют моделирующую функцию в биомембранах. Фосфолипиды и жирные кислоты можно охарактеризовать как наиболее чутко реагирующие компоненты клетки, изменяющие свою концентрацию в органах и тканях рыб уже на ранних этапах влияния различных факторов среды. Реакция на токсическое воздействие у рыб, как правило, не обходится без резкого увеличения интенсивности перекисных процессов, оценить которое можно по накоплению первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов и диенкетонов, и одного из конечных метаболитов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА).

В нашем институте в течение ряда лет проводятся мониторинговые исследования состояния ихтиофауны оз. Костомукшского, являющегося захоронением хвостов – техногенных отходов переработки сырья Костомукшского ГОКа. Деятельность данного предприятия привела к изменению основных физико-химических характеристик водоема: высокой минерализации и повышенной взмученности озера.

В 2010-2011 гг. проводился сбор проб печени щуки *Esox lucius* (7+-8+), плотвы *Rutilus rutilus* (4+-5+) и сига *Coregonus lavaretus* (3+, 4+, 7+, 8+) из двух водоемов: оз. Костомукшское (хвостохранилище Костомукшского ГОКа, опытный водоем) и оз. Каменное (контрольный водоем). С помощью стандартных методик проведен анализ липидного статуса печени рыб (общие липиды, индивидуальные фосфолипиды, жирнокислотный состав) и дана оценка интенсивности перекисных процессов с использованием некоторых показателей ПОЛ (диеновые конъюгаты, диенкетоны, малоновый диальдегид).

Сравнительный анализ липидного состава печени изученных рыб из оз. Каменное и хвостохранилища показал достоверные различия в содержании липидных компонентов у сига и плотвы (табл. 1). Увеличение содержания липидов в печени сигов из хвостохранилища обусловлено возрастанием доли ТАГ, причем, данные изменения характерны для старших возрастных групп рыб (рис. 1). Преобладание запасных липидов (ТАГ и эфиров холестерина) выявлено не только у сигов но и у других исследованных рыб из опытного водоема, хотя и в гораздо меньшей степени (табл. 1).

Биохимические механизмы адаптации рыб при техногенном воздействии, прежде всего, связаны с изменением функционирования биологических мембран, одним из показателей которого является соотношение структурных липидов – холестерина и фосфолипидов (ФЛ) (индекс Дьердии). Обнаружены различия ($p \leq 0,05$) в содержании данных компонентов в печени сига и плотвы из двух водоемов: снижение доли фосфолипидов и возрастание уровня холестерина, что соответствует большему значению индекса Дьердии в печени рыб из хвостохранилища Костомукшского ГОКа, по сравнению с контролем.

Более высокий уровень холестерина в печени рыб из опытного водоема, возможно, также связан с индукцией синтеза стероидных компонентов при неблагоприятном воздействии внешней среды. Согласно литературным данным, влияние техногенного загрязнения на метаболизм печени рыб приводит к ингибированию ферментов ЦТК и, как следствие, увеличению концентрации ацетил-КоА, который поступает на синтез холестерина и жирных кислот, что с возрастом может привести к стеаторозу и жировому перерождению печени рыб (Katti, Sathyanesan, 1983; Speranza, Colombo, 2009).

Различия в содержании фосфолипидов в печени рыб из двух водоемов характеризуются не только количественным, но и качественным составом. Обнаружен низкий уровень мажорных фосфолипидов (ФХ и ФЭА) и более высокое содержание сфингомиелина (СФМ) и лизофосфатидилхолина в печени рыб из хвостохранилища. Известно, что данные модификации связаны с жировой дистрофией печени (Marí, Fernández-Checa, 2007; Tessari et al., 2009).

Таблица 1. Содержание липидов в печени рыб из двух водоемов (% сухой массы)

| водоем* | щука | | сиг | | плотва | |
|--|------|--------|------|--------|--------|--------|
| | К | Х | К | Х | К | Х |
| общие липиды | 18,2 | 18,1 | 16,5 | 20,5** | 10,5 | 11,5 |
| фосфолипиды | 12,3 | 10,3 | 11,5 | 5,8** | 6,5 | 4,2** |
| триацилглицерины | 2,7 | 3,4** | 2,3 | 10,5** | 1,4 | 2,6** |
| холестерин | 2,3 | 2,6 | 2,5 | 3,8** | 1,9 | 3,1** |
| зфиры холестерина | 1,1 | 1,8 | 0,1 | 0,3** | 0,8 | 1,7** |
| холестерин / фосфолипиды | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,7** | 0,3 | 0,7** |
| фосфатидилинозитол | 0,39 | 0,3 | 0,27 | 0,28** | 0,08 | 0,1 |
| фосфатидилсерин | 0,41 | 0,4 | 0,19 | 0,17** | 0,14 | 0,08** |
| фосфатидилэтаноламин | 3,46 | 2,38** | 2,26 | 0,97** | 1,47 | 0,7** |
| фосфатидилхолин | 7,59 | 4,93** | 8,28 | 2,8** | 4,46 | 2,15** |
| лизофосфатидилхолин | 0,19 | 0,75** | 0,18 | 0,59** | 0,14 | 0,33** |
| сфингомиелин | 0,14 | 0,21** | 0,14 | 0,33** | 0,14 | 0,18 |
| неидентифицированные фосфолипиды | 0,12 | 1,33** | 0,19 | 0,65** | 0,08 | 0,66** |
| фосфатидилхолин / фосфатидилэтаноламин | 2,2 | 2,1 | 3,8 | 3,0** | 3,0 | 3,1 |
| фосфатидилхолин / лизофосфатидилхолин | 39,6 | 6,6** | 46,0 | 4,8** | 31,9 | 6,5** |

Примечания: * – здесь и далее краткое обозначение водоемов: К – озеро Каменное, Х – хвостохранилище Костомукшского горно-обогатительного комбината.

** – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$

Лизофосфатидилхолин играет моделирующую роль в биомембранах, и в небольших концентрациях выполняет медиаторную функцию, однако, значительное возрастание доли ЛФХ по отношению к своему метаболитическому предшественнику (ФХ) может свидетельствовать о деструкции биомембран гепатоцитов.

Следует отметить высокое количество неидентифицированных фосфолипидов у рыб из хвостохранилища (табл. 1), и, учитывая, что в состав данной группы соединений входят лизированные и окисленные ФЛ, можно предположить об активизации ПОЛ в печени рыб из водоема, подверженного антропогенной нагрузке. Хотелось бы обратить внимание, что различия в фосфолипидном спектре установлены не только у сига и плотвы, но и у щуки, хотя сравнение общих липидов в печени щук из исследованных водоемов достоверных отличий не выявило (табл. 1). Вероятно, данный факт свидетельствует о большей чувствительности состава индивидуальных ФЛ к изучаемым влияниям.

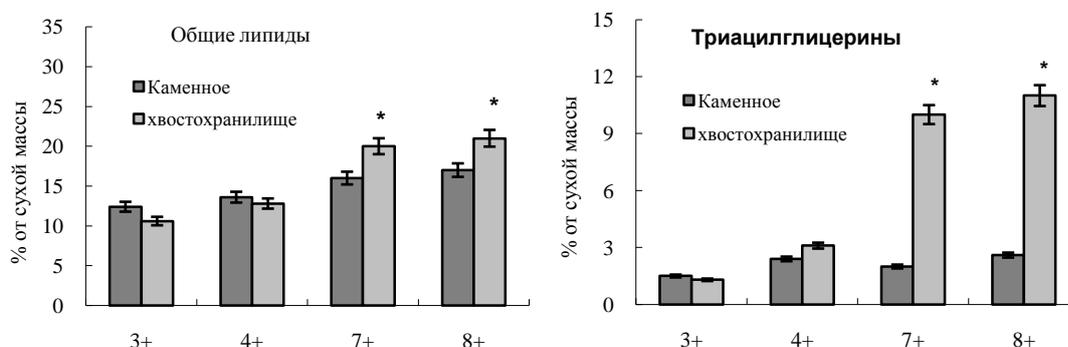


Рис. 1. Содержание общих липидов и триацилглицеринов в печени сига разных возрастных групп, выловленных из озера Каменное и хвостохранилища

* – отличие от контроля достоверно при $p \leq 0,05$

Анализ жирнокислотного состава печени рыб из опытного и контрольного водоемов показал значительные различия в соотношении основных групп жирных кислот (ЖК) у сигов. Установлен более низкий уровень полиеновых жирных кислот (ПНЖК) в печени сигов из хвостохранилища (табл. 2). Снижение соотношения сумм семейств n-6 и n-3 жирных кислот во многом определяет изменение жидкостных свойств биомембран гепатоцитов. Содержание моноеновых ЖК значительно преобладало в печени сигов из хвостохранилища, по сравнению с контролем (13,3 и 3,1 мг/г, соответственно) и положительно коррелировало с уровнем ТАГов ($r=0,98$; $p\leq 0,05$). Вероятно, это связано с тем, что именно моноеновые ЖК преимущественно входят в состав триацилглицеринов, которые с возрастом накапливаются в печени рыб. Достоверно низкое содержание эссенциальных ЖК в печени сигов из техногенного озера (табл. 2), свидетельствует о недостаточном поступлении линолевой и линоленовых кислот в составе пищи, и, возможно, определяется различием в кормовых базах исследуемых водоемов. В печени щук можно отметить только более низкое относительное содержание насыщенных ЖК у рыб хвостохранилища, которое компенсируется соответствующим повышением доли моноеновых ЖК (табл. 2).

Таблица 2. Жирнокислотный состав (% от суммы ЖК) и некоторые показатели перекисного окисления липидов (нмоль/г ткани) в печени рыб из двух водоемов

| водоем | щука | | сиг | |
|--------------------------------------|------|--------|------|-------|
| | К | Х | К | Х |
| 16:0 пальмитиновая кислота | 24,3 | 21,1* | 23,1 | 19,6* |
| сумма насыщенных кислот | 36,8 | 31,4* | 33,2 | 27,6* |
| 18:1(n-9) олеиновая кислота | 20,2 | 22,9 | 21,9 | 31,7* |
| сумма моноеновых кислот | 43,9 | 47,6* | 42,5 | 56,8* |
| 18:2 (n-6) линолевая кислота | 4,3 | 4,2 | 2,9 | 1,6* |
| 20:4 (n-6) арахидоновая кислота | 1,9 | 2,1 | 1,9 | 2,4 |
| сумма n-6 ПНЖК | 8,0 | 9,2 | 9,5 | 4,6* |
| 18:3 (n-3) линоленовая кислота | 1,4 | 1,8 | 0,9 | 0,6* |
| 20:5 (n-3) эйкозапентаеновая кислота | 2,4 | 2,6 | 2,5 | 2,7 |
| 22:6(n-3) докозагексаеновая кислота | 3,1 | 3,6 | 6,4 | 4,2* |
| сумма n-3 ПНЖК | 9,4 | 10,2 | 12,4 | 10,1* |
| сумма ПНЖК | 19,3 | 21,0 | 24,3 | 15,6* |
| n-6 ПНЖК/n-3 ПНЖК | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,5* |
| диеновые конъюгаты | 72,3 | 110,8* | 32,8 | 68,9* |
| диенкетоны | 56,7 | 93,3* | 76,4 | 87,1 |
| малоновый диальдегид | 34,3 | 57,1* | 64,2 | 96,8* |

Примечание: * – отличие от контроля достоверно при $p\leq 0,05$

Таким образом, установленные различия в составе индивидуальных ФЛ, соотношении n-6 ПНЖК/n-3 ПНЖК и индекса Дьердьюи свидетельствуют об изменении проницаемости биомембран печени сигов старших возрастных групп из хвостохранилища, и, как следствие, снижении функциональной активности мембрансвязанных ферментов и клеточных рецепторов, а также уменьшении скорости транспорта ионов, метаболитов и воды. Данные модификации связаны со снижением аэробного метаболизма в гепатоцитах (Чурова и др., 2011), и сопровождаются накоплением запасных липидов – триацилглицеринов, что в дальнейшем

приводит к дисфункции печени и ее жировому перерождению. Согласно анализу липидных показателей печени щук из двух водоемов, установленные различия носят адаптивный характер.

Свободные радикалы представляют собой чрезвычайно активные соединения, генерируемые в процессе жизнедеятельности организма, а также при воздействии различных неблагоприятных факторов окружающей среды. Повышение содержания свободных радикалов и связанное с этим усиление процессов перекисидации липидов может привести к изменению физико-химических свойств мембранных белков и липидов, активности мембрансвязанных ферментов, нарушению проницаемости мембран (в т.ч. для протонов и ионов кальция), ионного транспорта (ингибирование Na^+ , K^+ – АТФазы), уменьшению электрической стабильности липидного бислоя мембран (Владимиров, Арчаков, 1972; Пименов и др., 2004).

Активация процессов ПОЛ и накопление гидропероксидов липидов нарушают транспорт ионов, особенно ионов Ca^{2+} . Согласно литературным данным (Chang et al., 1987), увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке может стимулировать Ca^{2+} -зависимую фосфорилазу A_2 , что способствует продукции арахидоновой кислоты и ее метаболитов, которые активируют вход Ca^{2+} путем открытия ионных каналов (Irvine et al., 1990).

Известно, что пероксидный и фосфолипазный механизм повреждения липидов тесно взаимосвязаны. Окисленные фосфолипиды легче подвергаются гидролизу фосфолипазами, а фосфолипазы, в свою очередь, нарушая целостность липидного бислоя мембран, делают липиды более доступными для свободнорадикального окисления (Владимиров, Арчаков, 1972). В нашем исследовании установлена прямая корреляция между концентрацией арахидоновой кислоты и малонового диальдегида в печени щуки и сига из хвостохранилища ($r=0,78$, $p\leq 0,05$; $r=0,94$, $p\leq 0,05$, соответственно).

Диеновые конъюгаты и диенкетоны относятся к первичным продуктам окисления и их содержание в тканях характеризует раннюю стадию ПОЛ. Из-за более низкой энергии разрыва С-Н связи, преимущественно окисляются жирные кислоты с большим количеством двойных связей, такие как: арахидоновая, эйкозопентаеновая и докозогексаеновая кислоты; олеиновая и линолевая кислоты окисляются гораздо медленнее (Владимиров, Арчаков, 1972). Между уровнем диеновых конъюгатов и содержанием арахидоновой, эйкозопентаеновой и докозогексаеновой кислот в тканях исследованных рыб выявлена статистически значимая ($p\leq 0,05$) прямая корреляция.

Малоновый диальдегид является одним из конечных продуктов перекисного окисления и накопление именно этого соединения в тканях свидетельствует об интенсивности ПОЛ. Однако, следует учитывать, что оценивать степень данных процессов только по увеличению или снижению концентрации МДА не корректно, поскольку данные модификации могут быть связаны и с изменением содержания фосфолипидных компонентов, жирнокислотный состав которых является субстратом для окисления.

В печени сига и щуки из хвостохранилища, при более низких значениях ФЛ, по сравнению с контролем, значительно преобладало содержание МДА (рис. 2), что, вероятно, свидетельствует о высокой интенсификации ПОЛ в печени рыб, подверженных техногенной нагрузке.

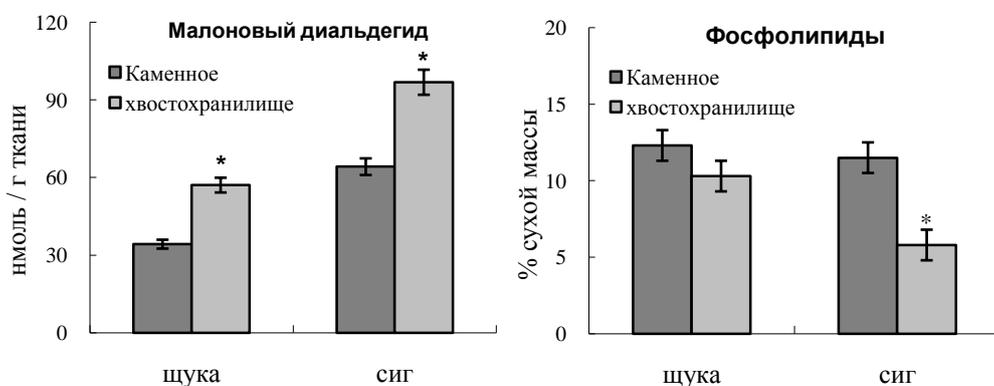


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида и фосфолипидов в печени сига и щуки из озера Каменное и хвостохранилища.

* - отличие от контроля достоверно при $p\leq 0,05$

В заключение хотелось бы отметить, что согласно проанализированным липидным параметрам, среди изученных видов рыб наиболее устойчивой к техногенному влиянию является щука. Вероятнее всего, это объясняется особенностями ее экологии: щука, в отличие от плотвы и сига, относится к консументам более высокого порядка, и, возможно, в процессе эволюции у данного вида сформировались особые приспособительные механизмы, в том числе и на биохимическом уровне, позволяющие пластичнее адаптироваться к меняющимся условиям внешней среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.» № 02.740.11.0700; Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» на 2012-2014 гг.; Программы фундаментальных исследований Обн РАН «Биологические ресурсы России: динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» на 2012-2014 гг.; гранта РФФИ № 11-04-00167-а и программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ № 1642.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков – М., 1972. 252 с.
2. Немова Н.Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н.Н. Немова, Р.У. Высоцкая. – М.: Наука. 2004. 215 с.
3. Пименов Ю. Т. Определение скорости пероксидного окисления липидов в печени русского осетра (*Acipenser güldenstädti Brandt*) in vitro в присутствии соединений ртути и порфиринов / Ю.Т. Пименов, В.П. Осипова, Л.А. Дьякова, Н.Т. Берберова, Е.Р. Милаева, Л.А. Филиппова, И.В. Броцман // Вестник АГТУ – 2004. № 4. Т. 23. С. 46-51.
4. Чурова М.В. Оценка состояния сигов *Coregonus lavaretus* L., обитающих в хвостохранилище горнообогатительного комбината, по некоторым биохимическим и молекулярно-генетическим показателям / М.В. Чурова, О.В. Мещерякова, Н.В. Ильмаст, Н.Н. Немова // Труды КарНЦ РАН. Серия биологическая – 2011. № 3. С. 137-146.
5. Chang J.J. Phospholipase A function and pharmacological regulation / J.J.Chang, H. Musser, H. McGregor // Biochem. Pharmacol. 1987. V. 36. P.2429-2436.
6. Irvine R.F. Inositol phosphates: proliferation, metabolism and function / R.F. Irvine, R.M. Moor, W.U. Pollock // Phil. Trans. Roy. Soc. – 1988. V. 320. P.281-298.
7. Katti S.R. Lead nitrate induced changes in lipid and cholesterol levels in the freshwater fish *Clarias batrachus* / S.R. Katti, A.C. Sathyanesan // Toxicology Letters. 1983. V. 19. № 1-2. P. 93-96.
8. Marí M. Sphingolipid signalling and liver diseases / M. Marí, J.C. Fernández-Checa // Liver International. – 2007. V. 27. № 4. P. 440-450.
9. Speranza E. D. Biochemical composition of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* along pollution gradients in the Paraná-Río de la Plata Basin / E.D. Speranza, J.C. Colombo // Journal of Fish Biology. – 2009. V. 74. № 6. P. 1226-1244.
10. 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.

THE LIPID COMPOSITION AND SOME PARAMETERS OF LIPID PEROXIDATION IN LIVER OF FISH UNDER ANTHROPOGENIC LOAD

O.B. Vasilyeva, M.A. Nazarova, P.O. Ripatty, N.N. Nemova
Institute of Biology of the Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia
e-mail: vasil@krc.karelia.ru

The objective of this study is to discern the effects of technogenic wastewater of Kostomuksha Mining and Processing Plant on the lipid composition of fish liver and some parameters of lipid peroxidation.

РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ В АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ РЫБ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ВОД ОТХОДАМИ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Вдовиченко Е.А., Высоцкая Р.У.

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

E-mail: elizabeth104@rambler.ru

Поверхностные воды суши – наиболее загрязняемые природные объекты, поскольку в них, в конечном счете, собираются промышленные и бытовые сточные воды, а также переносимые с воздушными массами загрязнения. Для выявления и прогнозирования негативных процессов, снижающих качество вод, оценки эффективности водоохранных мероприятий осуществляется мониторинг водных объектов. В Карелии одним из таких объектов, испытывающих значительную антропогенную нагрузку, является озерно-речная система Кенти-Кенто. Основным источником загрязнения данной системы являются сточные воды Костомукшского горно-обогатительного комбината. Верхнее озеро системы (Костомукшское) используется для хранения отходов производства. По химическому составу воды хвостохранилища отличаются высокой минерализацией (с преобладанием ионов калия, сульфатов и гидрокарбонатов) и аномальным соотношением щелочных и щелочноземельных катионов (Лозовик и др., 2003). Следует отметить, что произошедшие за время работы комбината (с 1982 г.) изменения в минеральном составе вод привели к существенным изменениям состояния биоты оз. Костомукшского, в частности, к обеднению видового состава ихтиофауны (Такшеев, 2005; Высоцкая и др., 2011). В уловах последних лет отмечены щука, плотва, сиг и уклейка. В настоящей работе в качестве объектов исследования были выбраны массовые виды рыб из Костомукшского хвостохранилища – щука *Esox lucius*, плотва *Rutilus rutilus* и сиг *Coregonus lavaretus*. Сравнение проводили с аналогичными показателями особей тех же видов, выловленных из оз. Каменного, находящегося на территории заповедника.

При проведении работ, связанных с биомониторингом и тестированием водоемов в настоящее время наряду с традиционными биологическими и гидрохимическими методами всё чаще применяют молекулярно-генетические и физиолого-биохимические методы. 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 (Немова, Высоцкая, 2004). При изучении влияния промышленных загрязнений разной химической природы на гидробионтов было показано, что в защитных реакциях на уровне клетки значительную роль играют ферментные системы лизосом (Такшеев, 2005; Высоцкая, Немова, 2008; Versteeg, Giesy, 1985; Köhler et al., 1991). Значительный интерес представляют ферменты углеводного обмена, так как углеводы, являющиеся самой распространенной группой органических соединений, выполняют в живых организмах множество важнейших функций. Наряду с хорошо известными, такими как энергетическая и структурная, углеводы и углеводсодержащие компоненты, выполняют целый ряд неканонических функций. Природными субстратами лизосомальных гликозидаз являются гликопротеины, протеогликаны, гликолипиды, полисахариды и другие вещества. Кроме того, сами лизосомальные ферменты представляют собой гликопротеины. Гликозилированные белки и липиды участвуют в передаче сигналов, регуляции процессов обмена, защите организма от влияния химических и физических факторов, предохраняют гликопротеины от действия протеолитических ферментов. Учитывая, что лизосомальные гликозидазы обладают широкой субстратной специфичностью и катализируют не только реакции гидролиза, но и трансгликозилирования, можно предположить их значительный вклад в защитные и приспособительные реакции в условиях воздействия промышленных поллютантов на обитателей водоемов. Целью данной работы являлось изучение роли лизосомальных гликозидаз (β -галактозидазы и β -глюкозидазы) в разных органах рыб при загрязнении среды обитания техногенными отходами железорудного производства. Исследования проводили в 2009, 2010 и 2011 гг.

Активность ферментов и содержание белка определяли в следующих органах рыб: почки, печень, жабры, гонады и мышцы. 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. При определении активности β -галактозидазы использовали в качестве субстрата раствор п-нитрофенил- β ,D-галактопиранозида, β -глюкозидазы – раствор п-нитрофенил- β ,D-глюкопиранозида на цитратном буфере. Активность обеих гликозидаз выражали в микромолях п-нитрофенола, освободившегося в условиях реакции за единицу времени (Высоцкая, Немова, 2008).

Полученные результаты показали различную реакцию у представителей разных видов на техногенные воды Костомукшского хвостохранилища.

Активность β -глюкозидазы у щук из хвостохранилища во всех органах, кроме гонад, была немного ниже, а β -галактозидазы значительно выше по сравнению со щуками из оз. Каменного (исключение – жабры) (Рис.1). По сравнению с данными, полученными в 2009 году, происходило увеличение активности β -глюкозидазы в гонадах и понижение активности β -галактозидазы в жабрах (Высоцкая и др., 2011).

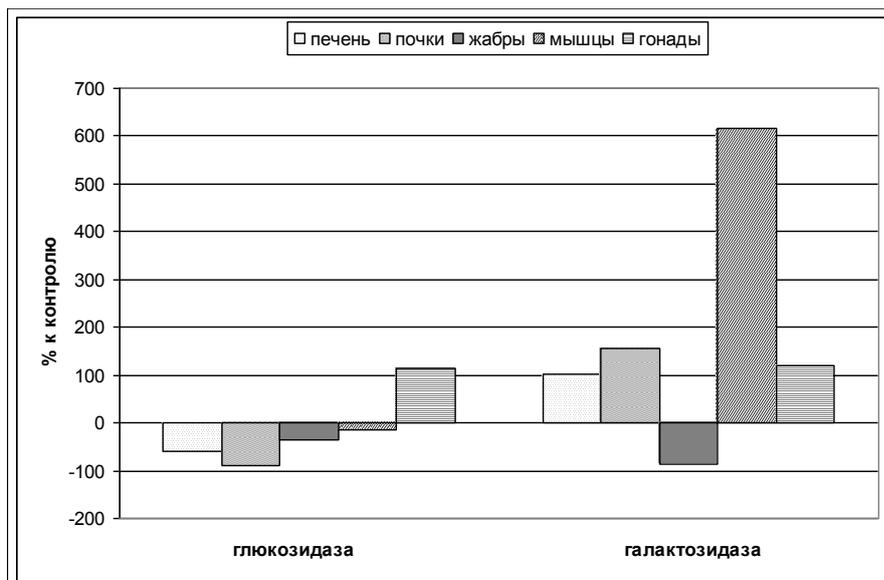


Рис. 1. Активность лизосомальных ферментов в органах самок щуки (второй стадии зрелости гонад) из Костомукшского хвостохранилища (контроль – щука из оз. Каменного).

Данные, по активности ферментов в органах плотвы, показывают, что в отличие от щуки у этого вида в хвостохранилище наблюдалось заметное повышение активности β -глюкозидазы. Снижение уровня β -галактозидазы происходило в гонадах и жабрах. В печени, почках и мышцах самок плотвы отмечено повышение уровня активности β -галактозидазы.

Активность β -глюкозидазы у самок сига из хвостохранилища в печени и мышцах значительно повышалась, а в жабрах была немного ниже по сравнению с сигами из оз. Каменного. Активность β -галактозидазы повышалась во всех органах у сига из хвостохранилища (Рис.2). Так, по сравнению с данными 2009 года, во всех органах происходило заметное повышение уровня активности β -галактозидазы. Возможно, такие изменения в активностях ферментов связаны с изменением температурных условий в водоеме, поскольку лето 2010 и 2011 годов характеризуется значительно более высокими температурами.

В 2009 году отмечалось, что содержание белка было повышенным в органах самок щуки в хвостохранилище. Результаты 2011 года показали, что происходит снижение уровня содержания белка в почках и мышцах. Данные 2009 года по биохимическим показателям сига, показывают, что уровень содержания белка у сига из хвостохранилища был повышен в жабрах и гонадах и понижен в печени, почках и мышцах. Аналогичные результаты наблюдались и в 2011 году. У самок плотвы из хвостохранилища также отмечено значительное возрастание общего белка во всех органах, и особенно заметно в гонадах, печени и жабрах.

Таким образом, полученные данные показывают, что лизосомальные гликозидазы проявляют высокую чувствительность к изменениям в химическом составе среды обитания рыб. Изменения активности отдельных гликозидаз по отношению к загрязнителям зависели от

видовой и половой принадлежности, стадии развития, физиологических особенностей организма. У рыб, обитающих в условиях постоянного воздействия поллютантов, формируется более высокий адаптивный потенциал.

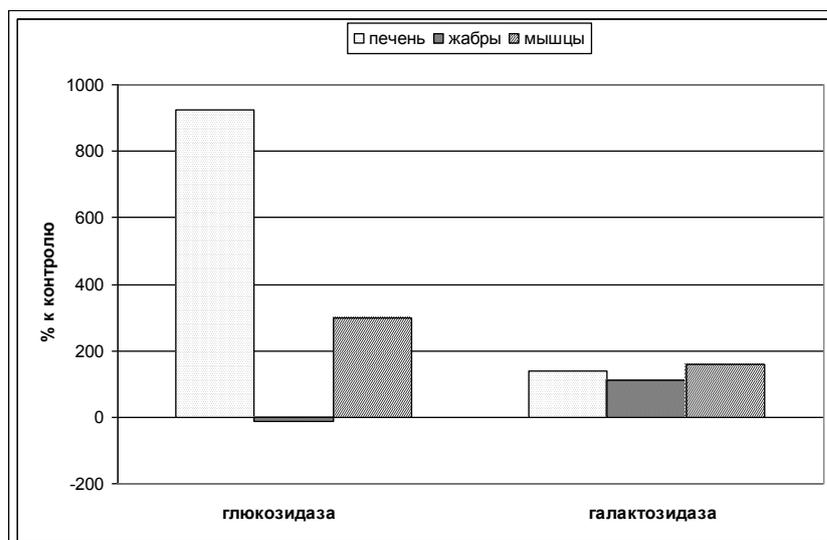


Рис. 2. Активность лизосомальных ферментов в органах самок сига (второй стадии зрелости гонад) из Костомукшского хвостохранилища (контроль – сиг из оз. Каменное).

Работа выполнена при поддержке Программы Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» НШ-3731.2010.4 и НШ-1642.2012.4, программ ОБН РАН «Биоресурсы 2009-2011», Президиума РАН «Биоразнообразия 2009-2011», Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы» № 28 (подпрограмма 2) 2012-2014 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.
2. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н., Вдовиченко Е.А. Лизосомальные гликозидазы в защитных и приспособительных реакциях водных организмов // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширенные материалы III международной конференции. М.: Изд-во РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева, 2011. С. 9-13.
3. Лозовик П.А., Куликова Т.П., Мартынова Н.Н. Мониторинг водных объектов республики Карелия в 1992-2000 гг. // Гидроэкологические проблемы Карелии и использование водных ресурсов. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2003. С. 135-144.
4. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М.: Наука, 2004. 216 с.
5. Такшеев С.А. Состояние рыбной части сообщества Костомукшского хвостохранилища и его оценка биохимическими методами: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2005. 23 с.
6. Köhler A. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators of toxic effects of environmental pollution // Compar. Biochem. and Physiol. C. 1991. V. 100, № 1-2. P. 123-127.
7. Versteeg D.J., Giesy J.P. Lysosomal enzyme release in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirochirus* Rafinesque) exposed to cadmium // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1985. V. 14. P. 631-640.

THE ROLE OF LYSOSOMAL GLYCOSIDASES IN ADAPTIVE RESPONSES OF FISH LIVING IN WATER POLLUTED BY WASTE OF IRON ORE PRODUCTION

Vdovichenko E.A., Vysotskaya R.U.

Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia.

The activity of the lysosomal glycosidases (β -glucosidase, β -galactosidase) and their role in the adaptive reactions of fish (pike, white-fish, roach) when exposed to the production of iron ore waste was investigated.

ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ CLADOCERA ИЗ ЛИТОРАЛИ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

В.Б. Вербицкий, Т.И. Вербицкая

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, Борок, Россия

e-mail: verb@biw.yaroslavl.ru

Каждый организм может существовать и развиваться лишь в определенном диапазоне температур среды. Точки, ограничивающие диапазон термической толерантности, называются кардинальными и определяются на основании смертности особей в крайних температурах этого диапазона. Положение кардинальных точек и связанная с ними устойчивость организмов к действию высоких или низких температур проявляют в животном мире значительную изменчивость. Устойчивость организма к повреждающему действию тепла характеризуется уровнем его терморезистентности (ТР), в качестве количественного показателя которой используют либо время пребывания животных при определенной повреждающей температуре до момента наступления теплового шока, либо значения температуры, при которой наступает тепловой шок (Ушаков, 1988). В большинстве зарубежных исследований в качестве показателя ТР пойкилотермных позвоночных и беспозвоночных используется критический температурный (или тепловой) максимум (КТМ). Этот термин используют для обозначения как метода, так и параметра. Метод КТМ был впервые применен Р. Ковлесом и С. Богертом (Cowles, Bogert, 1944), а в последствии модифицирован (Lowe, Vans, 1955; Hutchinson, 1961). Окончательное методическое оформление концепция КТМ получила в работах Д. Кокса (Cox, 1974) и К. Беккера и Р. Геновея (Becker, Genoway, 1979). КТМ - хороший показатель тепловой устойчивости видов и экологически ценный метод, так как он показывает температуру, при которой отмечаются первые признаки стресса (Paladino *et al.*, 1980; Díaz, Bückle, 1999). КТМ включает время и температуру как главные тестовые переменные (Becker и Genoway, 1979).

Определяли КТМ у ветвистоусых ракообразных из популяций литорали Рыбинского водохранилища (58°01'N, 38°12'E) на протяжении мая-сентября при температурах воды от 4.0 до 26.0° C и у *Bosmina longirostris* из популяции экспериментального пруда ИБВВ РАН при температурах воды 1.0-26.6°С.

КТМ определяли по моменту наступления обездвиживания фильтрующих ножек рачков. По результатам каждого опыта находили среднюю величину и ошибку средней ($\pm SE$). Животных, после их возвращения к температуре акклимации, больше в опытах не использовали. Для каждого вида проведены расчеты уравнений линейной зависимости величины КТМ от температуры среды. Достоверность различий между сезонными значениями теплоустойчивости за каждый год оценивали по t-критерию Стьюдента, F-критерию Фишера и критерию Колмогорова-Смирнова. Все расчеты вели на персональном компьютере с использованием стандартных пакетов статистических программ (Excel 2003, Statistica 8).

В пределах температурного диапазона 4.0-27.0°С у 9 из 12 видов, взятых из природных условий, наблюдалась достоверная линейная зависимость между значениями ТР и температурой среды обитания ($r^2 = 0.57-0.93$ при $P < 0.01$). Ранжирование видов по средним уровням КТМ, проведенное отдельно для весенне-летнего и летне-осеннего сезонов, выявило сходную картину – широкий диапазон значений КТМ – от 33.6 до 38.8°С в весенне-летний период (рис. 1а) и от 31 до 37.2°С в летне-осенний период (рис. 1б).

В весенне-летний период выделилось четыре группы видов. Первая группа демонстрировала низкие уровни КТМ (*B. longirostris*, *C. quadrangula* и *P. pediculus*). Вторая группа имела средние (промежуточные) уровни КТМ (*D. longispina*, *L. kindtii*, *E. lamellatus* и *A. rectangula*). В третью группу мы отнесли виды с высоким уровнем КТМ (*S. vetulus*, *A. harpae*, *S. mucronata* и *M. macrocopa*). У четвертой группы значения КТМ значительно различались по сезонам и эти виды могли входить в разное время в любую из первых трех групп (*D. brachyurum* и *Ch. sphaericus*).

В летне-осенний период раки, хотя и имели в целом более низкие уровни КТМ, но отмеченная выше тенденция также прослеживалась.

В группу с низкими уровнями КТМ мы отнесли *E. lamellatus* и *P. pediculus*, в промежуточную группу – *B. longirostris*, *A. harpae* и *D. longispina*, в группе с высоким уровнем

КТМ остался только *S. vetulus* и в группу с переменным уровнем КТМ вошли *D. brachyurum*, *Ch. sphaericus* и *C. quadrangula*.

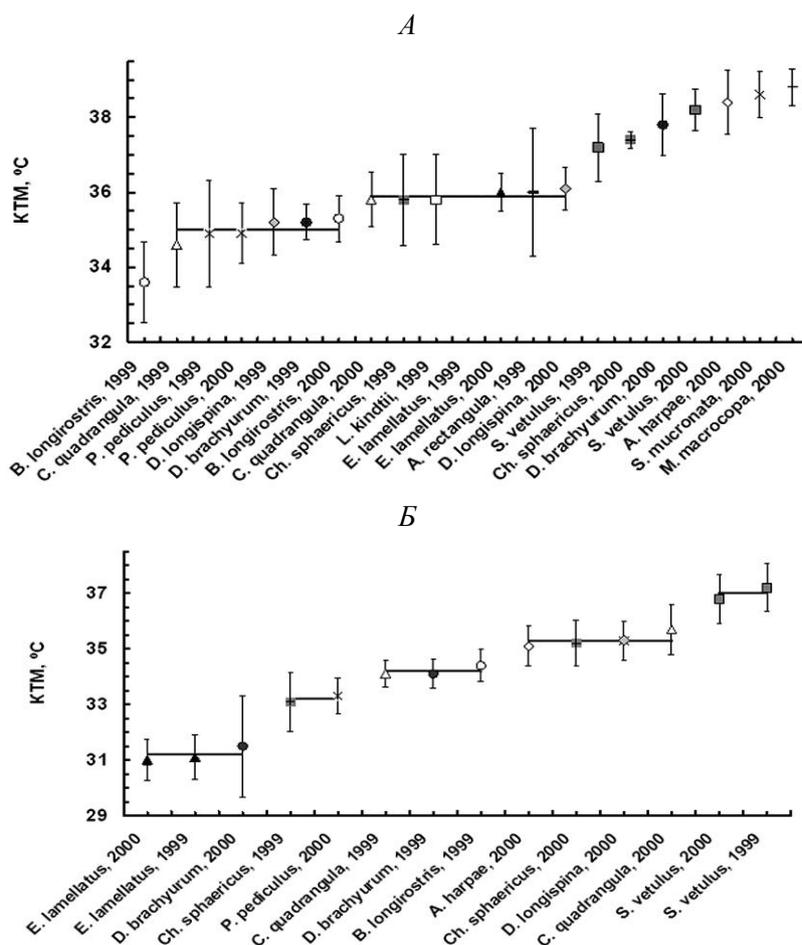


Рис. 1. Ранжированная по средним уровням КТМ последовательность видов *Cladospora* в весенне-летний (а) и летне-осенний (б) периоды 1999-2000 гг.

По обобщенным за весь период исследований данным построили аналогичный рассмотренным выше график ранжированной последовательности видов (Рис. 2).

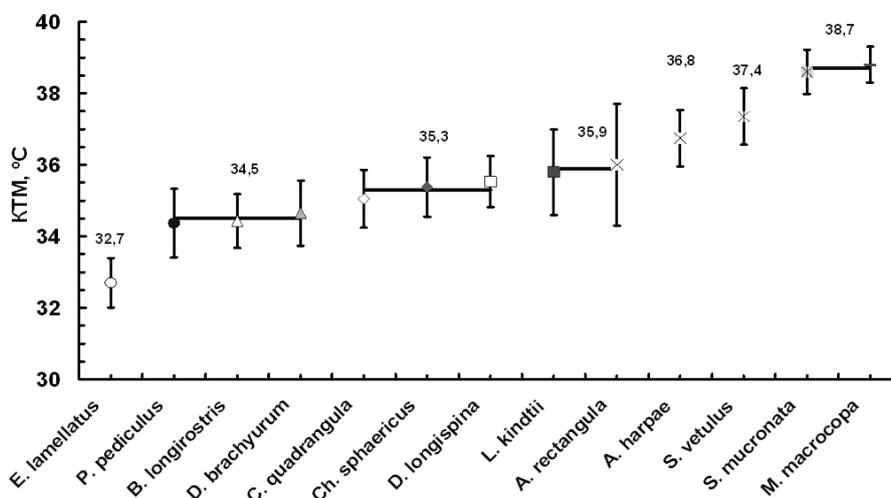


Рис. 2. Ранжированная по средним уровням КТМ последовательность видов *Cladospora* за весь период исследований с весны по осень 1999 и 2000 гг.

Уровень ТР у видов растет в ряду: *E. lamellatus* → (*P. pediculus* – *B. longirostris* – *D. brachyurum*) → (*C. quadrangula* – *Ch. sphaericus* – *D. longispina*) → (*L. kindtii* – *A. rectangula*) → *A. harpae* → *S. vetulus* → (*S. mucronata* – *M. macrocopa*). Отмеченная нами значительная вариабельность величины КТМ у многих видов понятна. Так как их естественная среда обитаний – прибрежная зона водоемов, где температура может колебаться в довольно широком диапазоне значений как в течение суток, так и в сезонном аспекте. В то же время видно, что независимо от года и сезона максимальный уровень КТМ демонстрируют зарослевый вид *S. vetulus*, обитающий у поверхностной пленки *S. mucronata* и известная своей термофильностью *M. macrocopa*, появляющаяся в планктоне Рыбинского водохранилища только в годы с жарким летом.

Таким образом, полученные нами данные по особенностям терморезистентности разных видов *Cladocera* в целом хорошо согласуются с особенностями их экологии.

Как известно, величина изменчивости показателя ТР является одним из показателей температурной пластичности организмов. Если ранжировать исследованные виды по возрастанию величины стандартного отклонения КТМ, получим следующий ряд: *M. macrocopa* → *S. mucronata* → *E. lamellatus* → [*D. longispina* → *B. longirostris* → *A. harpae* → *S. vetulus* → *C. quadrangula* → *Ch. sphaericus*] → *D. brachyurum* → *P. pediculus* → *L. kindtii* → *A. rectangula*. При этом, значения стандартного отклонения плавно нарастают в этом ряду от 0.5°C у *M. macrocopa* до 0.96°C (т.е. почти в 2 раза) у *P. pediculus*, а затем резко повышаются до 1.7°C у *A. rectangula* (т.е. в 3.4 раза).

Из приведенных данных видно, что виды, имеющие как наиболее низкую, так и наиболее высокую величину ТР (*M. macrocopa*, *S. mucronata* и *E. lamellatus*), проявляют относительно большую стенотермность. Виды, заключенные в квадратные скобки, имеют близкий уровень стандартного отклонения (от 0.72°C у *D. longispina* до 0.83°C у *Ch. sphaericus*). Максимальные значения изменчивости показателя, характеризующие эвритермность вида, демонстрируют хищные виды (*P. pediculus* и *L. kindtii*) и хидорида *A. rectangula*. Таким образом, данные по изменчивости показателя ТР разных видов *Cladocera* также согласуются с особенностями их экологии.

Попарное сравнение по критерию Стьюдента значений КТМ для каждой исследованной температуры показало, что у всех видов (кроме *S. vetulus*), исследованных в широком диапазоне температур, имеется две зоны плато (зоны регуляции уровня КТМ). Причем, эти плато имелись как при низкой, так и при высокой амплитуде колебаний температуры.

Полученные результаты хорошо согласуются с полевыми данными по наиболее благоприятным для жизнедеятельности видов температурным условиям и условиям достижения максимальных плотностей популяций в озерах и водохранилищах (Balayla, Moss, 2003; Geraldес, Boavida, 2004)

Сопоставление температурной зоны максимальных значений численности видов *Cladocera* с зонами регулирования КТМ демонстрирует их фактическое совпадение, при этом зона максимальных численностей располагается в верхней части зоны регулирования КТМ, из чего мы полагаем, что зоны регулирования КТМ на температурной шкале примерно совпадают с температурами нормальной жизнедеятельности видов, а максимальные значения зон регулирования соответствуют оптимальным температурам.

Таким образом, в диапазоне температур, естественных для вегетационного сезона региона Верхней Волги, у всех исследованных видов ракообразных из природных популяций наблюдается достоверная прямая зависимость между значениями ТР и температурой среды обитания. Впервые для эктотермных организмов у *Cladocera* выявлены не одна, а две зоны регуляции КТМ (зоны независимости функции от температуры) – в диапазонах пониженных и повышенных температур. Это свидетельствует о высокой экологической пластичности видов, позволяющей им акклиматизироваться к широкому диапазону температур, обычному для прибрежных биотопов, где они обитают.

Совпадение на температурной шкале зон регулирования КТМ с температурными условиями достижения высоких численностей видов в водоемах позволяет охарактеризовать их как зоны нормальной жизнедеятельности, а участки максимальных значений КТМ внутри зон регулирования, совпадающие с температурными условиями достижения максимальных численностей видов в водоемах – как оптимальные температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ушаков Б. П. Основы селекции особей по относительно лабильным физиологическим признакам на примере теплоустойчивости организма // Журнал общей биологии. 1988. Т. XLIX. №2. С. 236-244.
2. Balayla D.J., Moss B. Spatial patterns and population dynamics of plant-associated microcrustacea (Cladocera) in an English shallow lake (Little Mere, Cheshire) // Aquatic Ecology. 2003. V. 37. P. 417-435.
3. Becker C. D., Genoway R. G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. V. 4. №3. P. 245-256.
4. Cowles R. B., Bogert C. M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles // Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 1944. V. 83. P. 265-296.
5. Cox D. K. Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill // Thermal Ecology. Springfield: Nat. Tech. Inf. Serv. 1974. P. 158-163.
6. Díaz F., Bückle L. F. Effect of the critical thermal maximum on the preferred temperatures of *Ictalurus punctatus* exposed to constant and fluctuating temperatures // Journal of Thermal Biology. 1999. V. 24. P. 155-160.
7. Geraldес A. M., Boavida M. J. What factors affect the pelagic cladocerans of the meso-eutrophic Azibo Reservoir? // Annales de Limnologie. 2004. V. 40. Is. 2. P. 101-111.
8. Hutchinson, V. H. Critical thermal maxima in salamanders // Physiol. Zool. 1961. V. 34. P. 92-125.
9. Lowe C. H., Vance V. J. Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus* // Science. 1955. V.122. P. 73-74.
10. Paladino V. K., Spotila J. R., Schubauer J. P., Kowalski K. T. The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fish // Rev. Can. Biol. 1980. V. 39. P. 115-122.

THERMAL RESISTANCE OF CLADOCERA FROM THE LITTORAL OF THE RYBINSK WATER BASIN

V.B. Verbitsky, T.I. Verbitskaya

CTM Cladocera from littoral populations of the Rybinsk reservoir and experimental pond of the IBIW of the RAS (58°01'N, 38°12'E) determined in May-September at water temperatures from 1.0 to 26.6°C. At 9 from 12 species authentic linear dependence between values of CTM and temperature of an inhabitancy ($r^2 = 0.57-0.93$, $P < 0.01$) was observed. Level of CTM at species grows in a line: *E. lamellatus* (*P. pediculus* - *B. longirostris* - *D. brachyurum*) (*C. quadrangula* - *Ch. sphaericus* - *D. longispina*) (*L. kindtii* - *A. rectangula*) *A. harpae* *S. vetulus* (*S. mucronata* - *M. macrocopa*). These data is well be coordinated with features of ecology of species. The species having as lowest, and the highest value CTM (*M. macrocopa*, *S. mucronata* and *E. lamellatus*), show rather greater stenothermic. The maximal values of variability of the parameter, describing eurythermic of a species, show predatory species (*P. pediculus* and *L. kindtii*) and chydorids *A. rectangula*. Thus, the data on the variability of CTM of different species of Cladocera are also consistent with the characteristics of their ecology. In all species (except *S. vetulus*), studied over a wide temperature range, there are two zones of the plateau (zones of control of level of CTM). Moreover, these plateaus were both at low and at high amplitude of fluctuations in temperature. It is concluded that the zones of regulation of CTM on the temperature scale roughly coincide with the temperatures of normal life activity of species, and maximum values of the zone of control correspond to the optimal temperatures.

О ПОТЕНЦИАЛЬНОМ РИСКЕ ВЛИЯНИЯ ТРАНСГЕННОГО СЫРЬЯ В ИСКУССТВЕННЫХ КОРМАХ НА ИММУННЫЙ СТАТУС КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РЫБ

Е.В. Ганжа

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия
e-mail: evganzha@gmail.com

Как известно, биоинженерия позволяет формировать организм с заданными признаками за короткий период времени путём активного внедрения в нативный геном искусственно синтезированного вектора. Получаемые таким образом генно-модифицированные организмы (ГМО) потенциально полезны в качестве новых сортов/пород с улучшенными признаками, как для товарного производства, так и для развития научного знания при помощи модельных видов

(Кузнецов и др., 2004; Куликов, 2004; Кверчи, Маццара 2006; Winn, 2001; Wu, Lu, 2002). Однако любые изменения в структуре ДНК при генетических манипуляциях могут произвести эффект, который невозможно предсказать или проконтролировать (Кузнецов и др., 2004; Winn, 2001; Cellini et al., 2004). Введённый ген может нарушать метаболизм клетки и, следовательно, приводить к её дисфункции посредством различных механизмов, что определяет формирование биологических, экологических, пищевых и технических рисков (Куликов, 2004; Кузнецов и др., 2004; Ганжа, Банникова, 2010; Fagan, 1993; Anderson, 2004). Установлено, что транспозоны, которые применяются для осуществления трансгеноза, играют важную роль в процессе переноса лекарственной устойчивости между микроорганизмами, рекомбинациях и обмене генетическим материалом между различными видами в природе (горизонтальный перенос) (Diao et al., 2006). Добавление такого сырья в комбикорма может негативно влиять на физиологическое состояние, как организма-потребителя, так и на следующих уровнях пищевой цепи (Кузнецов и др., 2004; Ганжа и др., 2011; Fagan, 1993). Показано, что потребление ГМО крысами и мышами приводит к онкологическим заболеваниям, изменениям в печени и поджелудочной железе, в половых органах вплоть до бесплодия, аллергии, а также высокой смертности, снижении массы и заболеваемости в их потомстве (Malatesta et al., 2002, 2003; Ермакова, 2007; Ermakova, 2006). Есть и другие работы, подтверждающие патологические процессы в организме млекопитающих, потреблявших ГМО — кукурузу, картофель, горох (Pusztai, 1998; Fares, El-Sayed, 1999; Prescott et al., 2005; Seralini et al., 2007).

Сегодня в мировом растениеводстве зарегистрировано 144 трансгенных сортов линий, устойчивых в основном к гербицидам, насекомым и сорнякам (GM Crop Database, www.cera-gmc.org). К 2008 году биотехнологические культуры производились в 25 странах, а посевные площади для их выращивания с 1996 по 2008 гг. увеличились в 30–40 раз (James, 2009), что означает неизбежное массовое распространение ГМО на сырьевом и продовольственном рынках (Ганжа и др., 2011). В мировой аквакультуре также применяют ГМО в составе комбикормов (Ганжа и др., 2011; Ганжа, 2012). В этой связи необходимо подчеркнуть, что более трети потребляемой человеком рыбной продукции, выращивают в промышленных условиях с применением преимущественно искусственных кормов (Состояние мирового рыболовства..., 2009). Обычно ГМ сырьём является соевая и кукурузная продукция, поставляемая из Нидерландов, Бразилии, Аргентины, США, Литвы и других стран (Сергеев и др., 2007; Ганжа и др., 2011; Ганжа, 2012). Общеизвестно, что ингредиенты, входящие в состав искусственных кормов, не должны оказывать вредного действия на физиологическое состояние рыб (Щербина, Гамыгин, 2006; Ганжа и др., 2011). Тем не менее, в сое и продуктах её переработки содержится термоустойчивый изофлавоноид – генистеин, который конкурирует с нативными эстрогенами за рецепторы в клетках органов-мишеней, приводя к задержке размножения и ухудшению репродуктивной функции потребляющих его рыб, и замедлению роста во втором поколении (Владовская, 2002; Щербина, Гамыгин, 2006); а также другие вещества, которые вызывают неспецифические морфологические изменения в кишечнике и нарушают усвоения нутриентов (Francis et al., 2001; Nerme et al., 2005; Iwashita et al., 2008). Поскольку отмечено негативное влияние на здоровье рыб нативных сортов сои, то трансгенные линии, способные накапливать гербициды в своих тканях (Горовая и др., 2011), представляют собой ещё большую угрозу. Показано, что гербициды, в том числе широко применяемый глифосат Roundup, приводят к генетическим и функциональным изменениям в клетках растений: блокированию процессов клеточного цикла, угнетению синтеза ДНК/РНК, изменению количества белка, соотношений между его фракциями и отдельными аминокислотами (Щербина, Гамыгин, 2006; Горовая и др., 2011). А у рыб, в свою очередь, нарушают пластический обмен, приводят к патологическим изменениям в крови, печени и скелетной мускулатуре, воспалительным процессам и снижению неспецифической резистентности организма (Голованова, Аминов, 2011; Жиденко и др., 2011; Сох, 2004).

Первыми негативному воздействию ГМО подвергаются клетки и ткани желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), где происходит изначальный контакт с чужеродными ДНК, трансгенными белками и вторичными продуктами генной модификации. Известно, что большие последовательности ДНК-конструкций могут не расщепляться специальными ферментами, обнаруживаются во всех частях кишечника и, следовательно, могут быть абсорбированы в кровотоки, действуя как стрессор, и накапливаться в органах (Palka-Santini et al., 2003; Sanden et

al., 2004; Chainark et al., 2006). У атлантического лосося *Salmo salar* и радужной форели *Oncorhynchus mykiss* выявляли фрагменты трансгенной ДНК различной длины во всех отделах кишечника и слизистых клетках (Sanden et al., 2004; Chainark et al., 2006), показано, что ДНК, содержащаяся в потребляемой пище, абсорбируется в кровоток и накапливается в органах (Nielsen et al., 2005) и мышцах (Satoh, Chainark, 2010). При кормлении соей линии 40-3-2 или Roundup Ready у молоди атлантического лосося в кишечнике обнаружено повышенное Na⁺-зависимое поглощение D-глюкозы и увеличение уровня белка-котранспортёра SGLT1 в области пилорических придатков (Herme et al., 2005).

В опыте по кормлению атлантического лосося кукурузой линии MON 810 (YieldGard), трансгенной по δ-эндотоксину обнаружено снижение интенсивности роста из-за худшего поедания комбикорма (Sagstad et al., 2007) за счёт изменения вкусовых качеств этой линии в результате метаболического эффекта трансгенеза (Francis et al., 2001). При изучении его функционального статуса показано увеличение гепатосоматического индекса, повышение уровня белка антиоксидантной системы печени (HSP 70), вырабатываемого в ответ на воздействие различных стрессоров, изменение активности ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза и каталазы) в кишечнике и печени (Filho, 1996; Iwama et al., 1998; Sagstad et al., 2007). Известно, что действие δ-эндотоксина нарушает осмотический баланс и вызывает лизис эпителиальных клеток в кишечнике у некоторых видов чешуекрылых р. Lepidoptera (Кверчи, Маццара 2006). Следовательно, наличие δ-эндотоксина в YieldGard оказывает негативный эффект не только на насекомых для которых предназначен, но и на других животных, потребляющих ГМ кукурузу. У мышей, потреблявших картофель обработанный δ-эндотоксином, формировались гиперпластические клетки в подвздошной кишке, выявлено большое количество ядер гепатоцитов неправильной формы и многочисленными порами, развивалась гипертрофия и многоядерность эритроцитов (Fares, El-Sayed, 1999).

При изучении клеток крови у рыб, потреблявших ГМО, изменялась лейкоцитарная формула крови в сторону значительного повышения количества гранулоцитов и моноцитов, понижения количества лимфоцитов по сравнению с рыбами, питающимися нетрансгенным аналогом (Sagstad et al., 2007). У рыб, потреблявших корм, содержащий сою Roundup Ready, наблюдалось снижение среднего объёма эритроцитов и индекса селезёнки (Herme et al., 2005). Такие изменения авторы связывают с тем, что иммунный ответ организма начинает формироваться в крови, осуществляющей транспортную функцию питательных веществ от кишечника к тканям и органам.

Высказывается гипотеза о наличии новых ранее неизвестных белков в ГМ растениях, которые действуют как токсины или слабые аллергены (Shubbert et al., 1997; Sagstad et al., 2007). Так, Шуберт с соавторами (Shubbert et al., 1997) показал, что следовые количества потребленной чужеродной ДНК обнаруживаются в селезенке и лейкоцитах мыши, они способны действовать как аллергены, оказывая негативное влияние на иммунитет. Эти данные указывают на выраженный вторичный эффект ГМО на физиологическое состояние потребляющего его организма.

Следует отметить, что в ряде экспериментов, в которых использовали ГМО в качестве кормового объекта, отмечена нормальная экспрессия генов и уровень мРНК некоторых физиологически важных нативных белков (Sagstad et al., 2007).

Тем не менее, некоторые учёные указывают, что включение не более 6 % или 130 г/кг ГМ-сои (Roundup Ready) и кукурузы (MON810) в комбикорма является безопасным для коммерческого выращивания атлантического лосося (Herme et al., 2005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Владовская С.А. Некоторые проблемы производства кормов, используемых в аквакультуре // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура. Информационный пакет "Корма и кормление в аквакультуре". М.: изд-во ВНИЭРХ. 2002. Вып. 3. С. 7–19.
2. Ганжа Е.В. Физиологическое состояние лососевых рыб при использовании биотехнологий: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2012. 25 с.
3. Аквакультура и трансгенные технологии: области применения и проблемы безопасности (обзор) / Е.В. Ганжа, М.А. Банникова, Л.М. Федорова, Е.В. Микодина // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 4. С. 16–30.

4. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз рыб и их кормовых объектов / И.Л. Голованова, А.И. Аминов // Мат-лы IV Всеросс. Конф. по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» и школы-семинара «Современные методы исследования и оценки качества вод, состояния водных организмов и экосистем в условиях антропогенной нагрузки». Ч. 1. Борок, 2011. С. 95–100.
5. Биотехнологический метод минимизации пестицидного стресса сельскохозяйственных культур / А.И. Горюва, С.М. Лисицкая, А.В. Павличенко // VI Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Ч. 1. М., 2011. С. 190.
6. Ермакова И.В. Об опасности использования генетически модифицированных организмов в продуктах питания: ситуация в России и в мире // Экоинформ. 2007. №1. С. 8–15.
7. Использование пробиотика БПС-44 с целью предупреждения токсического эффекта влияния гербицидов на рыб / А.А. Жиденко, Е.В. Бибчук, В.В. Кривошипов // Сборник материалов III Международной конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб». Борок-Москва. 2011. С. 246–250.
8. Кверчи М., Маццара М. Характеристика сои Roundup Ready, кукурузы MON 810 и кукурузы Wt-176 // Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов: практическое руководство / М. Кверчи, М. Джермини, Г. Ван ден Эде – Люксембург. 2006. 21 с.
9. Генетически модифицированные организмы и биологическая безопасность / В.В. Кузнецов, А.М. Куликов, И.А. Митрохин, В.Д. Цыдендамбаев // Федеральный вестник экологического права. М.: Экоинформ. 2004. Вып. 10. 70 с.
10. Куликов А.М. ГМО и риски их использования // ГМО – скрытая угроза России. Материалы к Докладу Президенту Российской Федерации «По анализу эффективности государственного контроля за оборотом генетически модифицированных продуктов питания» (п. 3 Протокола № 4 совместного заседания Совета Безопасности и Президиума Госсовета РФ от 13.11.2003 г.). Москва. 2004. С. 47–73.
11. Сергеев Н.С., Вертель Ю.М., Костюкова Е.А. Контроль генетически модифицированных источников в рыбной муке и кормах для сельскохозяйственных животных // Рыбная промышленность. 2007. № 4. С. 44–46.
12. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры 2008. Департамент рыболовства и аквакультуры ФАО. Продовольственная и сельскохозяйственная организации объединенных наций. Рим, 2009. 199 с.
13. Щербина М.А., Гамыгин Е.А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре. М.: ВНИРО, 2006. 360 с.
14. Anderson L. Genetically engineered fish – new threats to the environment: Report. Greenpeace International. Amsterdam: Primaveraquint, 2004. 20 p.
15. Unintended effects and their detection in genetically modified crops / F. Cellini, A. Chesson, I. Colquhoun, A. Constable, H.V. Davies, K.H. Engel, A.M.R. Gatehouse, S. Karenlampi, E.J. Kok, J.J. Leguay, S. Lehesranta, H. Noteborn, J. Pedersen, M. Smith // Food and Chemical Toxicology. 2004. V. 42. P. 1089–1125.
16. Availability of genetically modified soybean meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets / P. Chainark, S. Satoh, T. Hino, V. Kiron, I. Hirono, T. Aoki // Fisheries Science. 2006. V. 72. P.1072-1078.
17. Cox C. Glyphosate // J. of pesticide reform. 2004. V. 24; № 4. P. 10–15.
18. Diao X., Freeling M., Lisch D. Horizontal transfer of plant transposons // PLoS Biol. 2006. V. 4; № 1 P. 5.
19. Influence of genetically modified soya on the birth-weight and survival of rat pups / Ermakova I.V. // Proc. «Epigenetics, Transgenic Plants and Risk Assessment». Frankfurt am Main. Germany. 2006. P. 41–48.
20. Assessing the safety and nutritional quality of genetically engineered foods / Fagan J. // US Congress Office of Technology Assessment (OTA). Harmful non-indigenous species in the United States. OTA-F-565. Washington. DC. USA. 1993. <http://www.psrast.org/jfassess.htm>
21. Fares N.H., El-Sayed A.K. Fine structural changes in the ileum of mice fed on endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes // Natural toxins. 1999. V. 6. P. 219–233.
22. Filho D.W. Fish antioxidant defenses – a comparative approach // Braz. J. Med. Biol. Res. 1996. V. 29. P. 1735–1742.
23. Francis G., Makkar H.P.S., Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish // Aquaculture. 2001. V. 199. P. 197–227.
24. Growth, feed utilization and health of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed genetically modified compared to non-modified commercial hybrid soybeans / G.-I. Hemre, M. Sanden, A.M. Bakke-Mckellep, A. Sagstad, A. Kroghdahl // Aquaculture Nutrition. 2005. V. 11. P. 157–167.

25. Heat shock protein expression in fish (Reviews) / G.K. Iwama, P.T. Thomas, R.B. Forsyth, M.M. Vijayan // *Fish Biology and Fisheries*. 1998. V. 8. P. 35–56.
26. Influence of certain soybean antinutritional factors supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal and liver morphology in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* / Y. Iwashita, T. Yamamoto, H. Furuita, T. Sugita, N. Suzuki // *Fisheries Science*. 2008. V. 74; № 5. P. 1075–1082.
27. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009 // ISAAA Brief № 41. Ithaca. New York. 2009. 44 p.
28. Ultrastructural, morphometrical and immunocytochemical analysis of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean / M. Malatesta, C. Caporalony, S. Gavaudan, M.B.L. Rocchi, C. Tiberi, G. Gazzanelli // *Cell Struct. Funct.* 2002. V. 27. P. 173–180.
29. Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on GM soybean / M. Malatesta, M. Biggiogera, E. Manuali, M.B.L. Rocchi, B. Baldelli, G. Gazzanelli // *Eur. J. Histochem.* 2003. V. 47. P. 385–388.
30. Dietary DNA in blood and organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / C. Nielsen, K. Berdal, A. Bakke-Mckellep, A. Holst-Jensen // *European Food Research and Technology*. 2005. V. 221. P. 1–8.
31. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins / M. Palka-Santini, B. Schwarz-Herzke, M. Hosel, D. Renz, S. Auerochs, H. Brondke, W. Doerfler // *Molecular genetics and genomics*. 2003. V. 270. P. 201–215.
32. Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity / V.E. Prescott, P.M. Campbell, A. Moore, J. Mattes, M.E. Rothenberg, P.S. Foster, T.J. Higgins, S.P. Hogan // *J. Agricult. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 9023–9030.
33. Puztai A. Report of Project Coordinator on data produced at the Rowett Research Institute // SOAEFD flexible Fund Project RO 818. 1998. <http://www.rowett.ac.uk/gmo/ajp.htm>
34. Evaluation of stress- and immune-responses biomarkers in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different levels of genetically modified maize (BT maize), compared with its near-isogenic parental line and commercial suprex maize / A. Sagstad, M. Sanden, Ø. Haugland, A.-C. Hansen, P.A. Olsvik, G.-I. Hemre // *J. Fish Dis.* 2007. V. 30. P. 201–212.
35. The fate of transgenic sequences present in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of GM soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. / M. Sanden, I.J. Bruce, M.A. Rahman, G.-I. Hemre // *Aquaculture*. 2004. V. 237. P. 391–405.
36. Satoh S., Chainark P. Availability of genetically modified feed ingredients for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* // *Bull. Fish. Res. Agen.* 2010. № 31. P. 63–69.
37. Seralini G.E., Cellier D., Vendomois J.S. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity // *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 2007. V. 52. P. 596–602.
38. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA / R. Schubbert, D. Renz, B. Schmitz, W. Doerfler // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. V. 94. P. 961–966.
39. Winn R.N. Transgenic fish as models in environmental toxicology // *ILAR Journal*. 2001. V. 42; №3. P. 322–329.
40. Wu J.-L., Lu J.-K. Transgenic fish for aquaculture // *Marine Biotechnology*. 2002. № 4. P. 328–337.

POTENTIAL RISK OF THE EFFECT OF TRANSGENIC PRODUCTS IN ARTIFICIAL FEED ON IMMUNE STATUS OF CULTIVATED FISHES (A REVIEW)

E.V. Ganzha

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: evganzha@gmail.com

Required parameters of the organism can be obtained after active introduction of artificially synthesized vector into native genome using bioengineering methods. As a result of such introduction, metabolism of the cell can be damaged leading to its dysfunction caused by different mechanisms that determines the appearance of biological, ecological, nutritional, and technical risks. The content of genetically modified organisms in the diet can lead to morphological and physiological disturbances in the gastro-intestinal tract. DNA of consumed food is absorbed in the blood and accumulated in the organs and muscles that have an effect on the content of immunocompetent proteins, antioxidant enzyme activity of the liver, and the blood leukocyte formula.

ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КИЖУЧА *ONCORHYNCHUS KISUTCH* ВО ВРЕМЯ НЕРЕСТОВОЙ МИГРАЦИИ В РАЗНЫЕ ВОДОЕМЫ П-ОВА КАМЧАТКА

Е.В. Ганжа, Е.Д. Павлов

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

e-mail: evganzha@gmail.com

Во время пика нерестового хода (конец августа – начало сентября) изучены производители кижуча *Oncorhynchus kisutch* из двух водоёмов п-ова Камчатка: р. Большая Воровская (западное побережье) и оз. Большой Виллой (восточное побережье), различающихся гидролого-морфологическим режимом (Горин, 2009; 2012). Река Б. Воровская практически не изучена, и характеристика её устьевой части, где были выловлены дикие производители кижуча, дана в соответствии с описанием сходной по гидрологическому режиму р. Большой. Устье эстуарного водотока реки Б. Воровская от моря отделено песчано-галечной косой-пересыпью, где приливы могут достигать 2.6 м в сизигию (Горин, 2009). За счёт этого, солёность воды в устье реки Б. Воровская может изменяться в течение суток от 0 ‰ до 25 ‰, данные предоставлены по устному замечанию С.Л. Горина. Озеро Б. Виллой входит в общий состав устьевой области реки Большой Виллой, его дно представляет собой замкнутую котловину, отделённую от океана высоким порогом, в результате происходит замедленная смена воды в водоёме, а её солёность изменяется специфическим образом (Горин, 2009, 2012). Так, в августе в оз. Б. Виллой распределение солёности воды следующее – до глубины примерно 1.5 м она составляет 8–12 ‰, на большей глубине – 20 ‰ и более (Горин, 2012). На северном берегу озера расположен Вилючинский ЛРЗ, поэтому в озере обитают как дикие особи, так и воспроизводимые искусственным путём (далее «виллойский» кижуч).

Лов кижуча осуществляли речными закидными неводами. В процессе биологического анализа (Правдин, 1966) у кижуча измеряли длину тела по Смитту (AC), длину до конца чешуйного покрова (AD), полную массу тела и массу гонад, определяли пол, стадию зрелости

гонад, коэффициент упитанности (K_y) по Кларк по формуле: $K_y = \frac{W}{AD^3} \times 100\%$, где W –

масса тела без внутренностей. Физиологическое состояние организма рыб оценивали по содержанию общего белка, креатинина, С-реактивного белка (СРБ), титр антиядерных антител (титр-АНА), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ-подобный гормон) и лютеинизирующего гормона (ЛГ-подобный гормон, измеряли только у «виллойского» кижуча) в крови при помощи биохимических и иммуноферментных методов. Кровь прижизненно отбирали из хвостовой вены в пробирки с ЭДТА и центрифугировали 7 минут при 3000 об/мин, плазму хранили при минус 12–18 °С, показатели определяли в трёх повторностях.

Средняя длина и масса тела у самцов дикого кижуча 64.9 ± 1.61 см и 3625 ± 237.9 г больше, чем у самок 63.3 ± 0.70 см и 3298 ± 110.69 г, соответственно (различия недостоверны, $p > 0.05$). Гонады мигрирующего дикого кижуча были на III–IV стадии зрелости, а средний ГСИ у самок (10.98 %) достоверно больше ($p < 0.001$), чем у самцов (7.70 %). K_y диких рыб различается не значительно, но у самцов несколько выше (1.32 %), чем у самок (1.30 %). Средняя длина и масса у самцов «виллойского» кижуча были выше (63.1 ± 1.19 см и 2952 ± 177.1 г), чем у самок (60.1 ± 0.79 см, 2811 ± 122.9 г), различия не достоверны ($p > 0.001$). Гонады у всех рыб находились на IV стадии зрелости. У самцов средний ГСИ (23.30 %) и K_y (1.15) ниже, чем у самок – 50.81%, и 1.28 %, соответственно, различия достоверны ($p < 0.05$). Полученные данные по размерному составу соотносятся с наблюдениями Ж.Х. Зорбиди (2010).

Сравнительный анализ кижуча из разных водоёмов п-ова Камчатка показал, что средняя длина самцов и самок из оз. Б. Виллой несколько меньше (различия достоверны только для самок, $p < 0.05$), чем у рыб из естественной популяции, а средняя масса – достоверно больше у диких производителей ($p < 0.05$). Масса гонад у особей обоего пола «виллойского» кижуча достоверно выше, чем у рыб из р. Б. Воровской ($p < 0.001$), а ГСИ у самок различается в 5 раз. Выявленные различия связаны с тем, что рыбы из смешанной популяции изучены при искусственном воспроизводстве, а самки дикого кижуча – во время нерестового хода.

По содержанию общего белка выявлены достоверные ($p < 0.001$) половые различия (табл. 1). Установлена отрицательная взаимосвязь по содержанию метаболических показателей у самок и самцов различного происхождения. Так, у самок дикого кижуча уровень ОБ ниже в 1.8 раз, чем у самцов, а креатинина – несколько выше, и оба показателя варьируют в значительных пределах. При этом у «виллойского» кижуча наблюдается обратная тенденция. Концентрация ОБ и креатинина у диких самцов выше ($p < 0.05$), чем у «виллойских» рыб, а у самок из р. Б. Воровской достоверно больше лишь содержание креатинина ($p < 0.05$). В целом уровень креатинина в крови кижуча в 3–5 раз больше, чем у микижи *Parasalmo mykiss*, обитающей в пресной воде (Пустовит, Пустовит, 2005). Известно, что у лососевых рыб из естественных популяций содержание общего белка в зависимости от возраста, стадии онтогенеза и условий окружающей среды может значительно изменяться (Пустовит, Пустовит, 2005), это подтверждают полученные нами результаты. Повышенное содержание ОБ и креатинина у диких рыб, вероятно, связано с процессами адаптации их осморегуляторной системы к обитанию в воде с непостоянной солёностью, заметно изменяющейся в течение суток. В отличие от дикой популяции «виллойский» кижуч обитает в воде с относительно постоянной солёностью 10 ‰ – 20 ‰, изменяющейся в зависимости от глубины на которой находится. Высокий уровень креатинина в крови связывают с интенсивным энергетическим обменом в мышечных тканях (Аминьева, Яржомбек, 1984; Salomons, Wyss, 2007). Поскольку лососи осуществляют длительную нерестовую миграцию, в течение которой производители затрачивают много энергии, практически не питаются, то это указывает на начало использования ресурсов тела и повышенный белковый обмен в организме, а следовательно и увеличение белка в крови.

Таблица 1. Содержание общего белка и креатинина в крови производителей кижуча

| Водоём | Пол | Общий белок, г/л | Креатинин, ммоль/л |
|-----------------|-----|--------------------------------|---------------------------------|
| р. Б. Воровская | ♂ | 108.8 ± 7.46 64.1–154.4 | 91.1 ± 8.43 69.8–136.2 |
| | ♀ | 61.6 ± 9.37 33.7–108.5 | 100.6 ± 12.36 57.0–163.2 |
| оз. Б. Виллой | ♂ | 64.0 ± 14.31 24.4–157.2 | 67.2 ± 9.54 37.7–138.8 |
| | ♀ | 74.6 ± 9.63 47.9–125.0 | 54.7 ± 2.59 43.7–67.3 |

Не исключено, что выявленные различия содержания ОБ в крови могут быть обусловлены видовыми и экологическими особенностями, либо связаны со степенью готовности к нересту и продолжительностью нерестового хода. Вероятно, уровень белка в крови повышается в результате активации метаболических процессов в организме при продолжительной энергоёмкой нерестовой миграции у диких рыб. У «виллойского» кижуча отмечена положительная связь между содержанием ОБ и ФСГ (коэффициент корреляции у самок – 0.67, у самцов – 0.70), что, вероятно, связано с созреванием половых продуктов этих рыб. Ранее было показано, что на изменение содержания ОБ могут оказывать влияние заболевания и различные неблагоприятные факторы, вызывая сильный стресс в организме (Mlay et al., 2007; Inyang et al., 2010).

Средняя концентрация СРБ в крови у «виллойских» самок и самцов одинакова (табл. 2), однако у последних варьирует в больших пределах. Выявлена положительная взаимосвязь у виллойских рыб между содержанием СРБ и ГСИ: у самок коэффициент корреляции равен 0.84 и у самцов – 0.94, что может указывать на параллельное созреванию половых продуктов, развитие аутоиммунного процесса в организме. Вероятно, содержание СРБ в крови можно рассматривать как специфичное относительно созревания рыб и продолжительности нерестовой миграции, а его биологическая роль, по всей видимости, заключается в усилении функционирования иммунной системы для обеспечения жизненно важных функций организма в этот период (Ramos, Smith, 1978; Liu et al., 2004). У кижуча обоего пола из естественной популяции уровень СРБ был достоверно выше ($p < 0.05$), чем у «виллойского». У диких особей положительная корреляция между СРБ и ГСИ не выявлена.

Средняя величина другого показателя гуморального иммунитета, характеризующего аутоиммунные заболевания – титра-АНА, у всех исследованных производителей – позитивная (выше 1.1 МЕ/мл), а у диких самцов кижуча достигает 2.9 и варьирует в больших пределах (табл. 2). Полученные результаты указывают на наличие аутоиммунного процесса в организме изученных рыб и согласуются с моноциклическостью данного вида. У самок и самцов кижуча из обоих водоёмов титр-АНА практически не различается ($p>0.05$), что указывает на отсутствие половой специфичности проявления посленерестовой гибели. Следует отметить, что между уровнем антинуклеарного фактора в крови и степенью тяжести патологии не существует взаимосвязи, что подтверждает отсутствие корреляции с другими исследованными показателями.

Таблица 2. Гуморальные факторы иммунитета и содержание гонадотропных гормонов в крови производителей кижуча

| Водоём | Пол | СРБ, мг/л | Титр АНА, МЕ/мл | ФСГ-подобный гормон, мМЕ/мл | ЛГ-подобный гормон, мМЕ/мл |
|----------------|-----|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| р. Б.Воровская | ♂ | 4.7 ± 0.75 2.9–7.3 | 1.6 ± 0.22 0.8–2.9 | 17.3 ± 9.37 1.9*–91.3 | –** |
| | ♀ | 4.7 ± 0.52 3.3–6.0 | 1.7 ± 0.11 1.2–2.2 | 16.9 ± 10.96 0.0*–114.1 | –** |
| оз. Б.Виллой | ♂ | 3.5 ± 0.87 1.9–6.8 | 1.6 ± 0.09 1.1–2.0 | 4.8 ± 2.48 0.6*–23.2 | 6.1 ± 1.19 0.1*–28.7 |
| | ♀ | 3.5 ± 0.33 2.6–4.3 | 1.9 ± 0.12 1.4–2.4 | 1.9 ± 0.81 0.1*–6.5 | 5.5 ± 0.67 0.6*–12.4 |

Примечание: * – ниже предела чувствительности тест-наборов, использованных для определения ФСГ и ЛГ; ** – содержание показателя не измеряли.

Выявлены половые различия содержания ФСГ-подобного гормона (у самок ниже, чем у самцов), но только у «виллойских» производителей эти различия достоверны ($p<0.05$), и более выражены у самок – средний уровень ФСГ-подобного гормона в 2.5 раза ниже, чем у самцов (табл. 2). Следует отметить, что только у одной самки и одного самца из естественной популяции выявлено высокое содержание гормона – 91.3 мМЕ/мл и 114.1 мМЕ/мл. У других рыб ФСГ-подобный гормон не превышал 20 мМЕ/мл. У диких самцов средняя концентрация этого гормона в 3.6 раза выше, чем у «виллойских», а у самок – в 9 раз (различия достоверны, $p<0.05$). У виллойских рыб выявлена положительная корреляция содержания ФСГ-подобного гормона и ОБ (коэффициент корреляции у самок – 0.67 и самцов – 0.70), что мы связываем с завершением вителлогенеза в их гонадах.

Полученные результаты отражают динамику гонадотропных гормонов у производителей из р. Б. Воровская по мере приближения к завершающим этапам гаметогенеза. У рыб из оз. Б. Виллой ФСГ-подобный гормон завершил свою функцию, его концентрация резко снизилась, и начал преобладать ЛГ-подобный гормон, регулирующий овуляцию и спермиацию. Среднее содержание ЛГ-подобного гормона и пределы его варьирования в крови самцов кижуча из оз. Б. Виллой несколько выше, чем самок, что, вероятно, указывает на его интенсивную биологическую утилизацию организмом для осуществления спермиации и отражает более раннюю готовность рыб к нересту (табл. 2). Предположительно, уровень ЛГ-подобного гормона, недостаточно высокий, чтобы вызвать нормальную овуляцию у самок, и отражает особенности искусственного получения половых продуктов на ВЛРЗ, когда у производителей получают икру, вскрывая брюшную полость, для одновременного оплодотворения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Горин С.Л. Гидролого-морфологические процессы в эстуариях Камчатки: Автореф. дисс. ... канд. гидр. наук. – М., 2009. 26 с.
2. Горин С.Л. Гидролого-морфологические процессы в эстуариях Камчатки. Часть 1. Эстуарий реки Большой Виллой. Гидролого-морфологические процессы в эстуарии реки Большой Виллой (восточное побережье камчатки) // Водные ресурсы. 2012. Т. 39; № 3. (в печати).
3. Зорбиди Ж.Х. Кижуч азиатских стад. Петропавловск-Камчатский: изд-во КамчатНИРО. 2010. 306 с.
4. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М.: Пищевая промышленность. 1966. 376 с.

5. Пустовит Н.С., Пустовит О.П. Некоторые гематологические показатели молоди камчатской микижи *Parasalmo mykiss* // Вопросы ихтиологии. 2005. Т. 45; № 5. С. 680–688.
6. Inyang I.R., Daka E.R., Ogamba E.N. Effect of sub-lethal concentrations of diazinon on total protein and transaminase activities in *Clarias gariepinus* // Current research journal of biological sciences. 2010. V. 2; № 6. P. 390–395.
7. Effect of turpentine oil on C-reactive protein (CRP) production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / Y. Liu, T. Iwasaki, S. Watarai, H. Kodama // Fish Shellfish Imm. 2004. V. 17; № 3. P. 203–210.
8. Total plasma proteins and hemoglobin levels as affected by worm burden in freshwater fish in Morogoro, Tanzania / P.S. Mlay, M. Seth, S.T. Balthazary, R.T. Chibunda, E.C.J.H. Phiri, O.B. Balemba // Livestock Research for Rural Development. 2007. V. 19; № 19. 10 p. <http://www.lrrd.org/lrrd19/2/mly19019.htm>
9. Ramos F., Smith A.C. The C-reactive protein (CRP) test for the detection of early disease in fishes // Aquaculture. 1978. V. 14; № 3. P. 261–266.
10. Salomons G. S., Wyss M. Creatine and creatine kinase in health and disease // Series: Subcellular Biochemistry. 2007. Vol. 46; XVIII 352 p.

ASSESSMENT OF PHYSIOLOGICAL STATE OF COHO SALMON *ONCORHYNCHUS KISUTCH* DURING SPAWNING MIGRATION IN DIFFERENT WATER BODIES OF THE KAMCHATKA PENINSULA

E.V. Ganzha, E.D. Pavlov

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

E-mail: evganzha@gmail.com

The spawners of coho salmon were investigated during a peak of spawning migration into the Bolshaya Vorovskaya River and Bolshoi Vilyui Lake with different hydrological and morphological regimes. In the females of coho salmon from the Bolshaya Vorovskaya River, a level of total protein is lower at 1.8 times ($p < 0.001$), and a level of creatinine is slightly higher (with wider range of the values) than in the males. The inverse relationship is observed for the spawners of Bolshoi Vilyui Lake. A negative relationship on the content of total protein and creatinine in the females and males is revealed. Average concentration of C-reactive protein in the blood of females and males of coho salmon from both water bodies is similar, but it is more variable in the males. A positive relationship between the content of C-reactive protein and gonadosomatic index (GSI) (with the correlation coefficients 0.84 and 0.94 for females and males, respectively) is registered in the fish from Bolshoi Vilyui Lake. In all spawners, ANA titer exceeds 1.1 and does not differ significantly that suggests an occurrence of autoimmune process in the organism and in accordance with monocyclic life history of the species. In the males from the Bolshaya Vorovskaya River, a level of FSH-like hormone at 3.6 times higher ($p < 0.05$) than that from Bolshoi Vilyui Lake; in the females it is higher at 9 times ($p < 0.05$). In the spawners from Bolshoi Vilyui Lake, the function of FSH-like hormone is completed, its concentration decreases, and a level of LH-like hormone is increased.

РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА И ЕЁ КОМПОНЕНТА – СЕРОТОНИН-МОДУЛИРУЕМОГО АНТИКОНСОЛИДАЦИОННОГО БЕЛКА В ТЕРМОРЕГУЛЯЦИОННОМ ПОВЕДЕНИИ КАРПА *CYPRINUS CARPIO*

Д.В. Гарина*, А.К. Смирнов*, В.В. Кузьмина*, А.А. Мехтиев**

* *Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия*

** *Институт физиологии им. А.И. Караева НАН Азербайджана, Баку*

e-mail: garinadv@mail.ru

Терморегуляционное поведение известно как основная форма адаптации костистых рыб к меняющимся температурным условиям среды, направленная на выбор температурных условий, оптимальных для текущего физиологического состояния организма. У ряда видов рыб описана также другая форма адаптации, не связанная с поведением - несократительный термогенез, обусловленный выбросом ионов кальция из саркоплазматического ретикулума, активацией Ca^{2+} -АТФазы в специализированных мышечных клетках термогенного органа и усилением вследствие этого выработки ими тепла (Block, 1994). Несмотря на возрастающий интерес к сравнительным и эволюционным аспектам физиологии терморегуляции, появление обзорных работ, посвящённых этому вопросу (Vicego et al., 2007), в целом данная проблема в отношении

холоднокровных животных разработана гораздо слабее. Анатомические структуры мозга и нейротрансмиттеры, вовлечённые в поведенческую терморегуляцию, слабо изучены у всех видов позвоночных животных, включая костистых рыб (по: Vico et al., 2007).

Известно, что моноаминергические системы мозга рыб чувствительны к термальному стрессу: повышение температуры акклимации на 5–6°C по сравнению с оптимумом приводит к активизации серотонинергической системы гипоталамуса и снижению содержания серотонина (Tsai, Wang, 1997). Вызванное фармакологическими методами повышение содержания серотонина в мозге ведёт к увеличению избираемой температуры (ИТ) у костистых рыб. Наиболее значительный эффект, – увеличение ИТ на 7°C, – отмечен при введении микродоз серотонина в область гипоталамуса у тиляпии *Oreochromis mossambicus*, эффект развивается уже через 4.3 мин после введения препарата (Tsai et al., 2002). Однако необходимо отметить, что использование авторами различных методов введения и доз серотонина, а также слишком коротких сроков наблюдения часто приводит к неоднозначным результатам.

Одним из компонентов серотонинергической системы мозга позвоночных животных является серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок (СМАБ), состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой 60 и 126 кДа. Установлено, что его синтез в мозге животных напрямую связан с метаболизмом серотонина (Мехтиев, 2000). Выявлен ряд важнейших функций белка СМАБ в поддержании клеточного и тканевого гомеостаза организма: антимутагенный, антиоксидантный, участие в поддержании водно-солевого равновесия (Мехтиев, Мовсум-заде, 2008; Мустафаев, Мехтиев, 2008; Бахшалиева и др., 2010). Сведения о возможном участии белка СМАБ в терморегуляции у рыб отсутствуют.

Цель настоящей работы – исследование роли серотонина и белка СМАБ при их внутримозговом введении в терморегуляционном поведении карпа *Cyprinus carpio* L. в длительном эксперименте.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для проведения экспериментов получен в результате естественного нереста производителей карпа и последующего выращивания молоди в течение летнего периода в прудах стационара полевых и экспериментальных исследований ИБВВ РАН «Сунога». В сентябре молодь была перевезена и акклимирована к лабораторным условиям, где содержалась в течение осенне-зимнего периода вплоть до начала экспериментов.

Проведено два эксперимента: в декабре 2011 г. (исследование влияния СМАБа на избираемые температуры карпа) и в феврале 2012 г. (исследование влияния серотонина). Возраст молоди составлял 6–7 мес. и 8–9 мес. на момент первого и второго экспериментов соответственно. В каждом эксперименте было сформировано две группы рыб по 10 экземпляров (контрольная и опытная). В первом эксперименте средняя масса карпов составила 7.1±0.4 г и 7.7±0.4 г, длина 81±1.7 мм и 85±1.2 мм, во втором – 6.7±0.2 г и 10.3±0.7 г, 78±0.8 мм и 90±2 мм в контрольной и опытной группах соответственно. Температура предварительной акклимации в обоих экспериментах – 18–19°C, продолжительность – 7 и 9 сут в первом и втором экспериментах соответственно. Прочие параметры – условия содержания рыб, экспериментальная установка, длительность и схема проведения экспериментов были одинаковыми.

После окончания периода акклимации рыбы подвергались процедуре внутривенной инъекции препаратов.

Используемые препараты: 1. Серотонин-модулируемый антиконсолидационный белок (СМАБ; молекулярная масса 186 кДа) получали путём препаративного выделения из мозга быка, которое осуществлялось дробным осаждением 40%-ным сульфатом аммония с последующей гель-хроматографией на Сефадексе G-150, под контролем иммуноферментного анализа с применением иммуноглобулинов к ранее идентифицированной электрофоретической белковой фракции №28. Гомогенность белка оценивали с помощью электрофореза в 5%-ном полиакриламидном геле. Выделенный белок доводили забуференным физиологическим раствором для холоднокровных животных (0.7%-ный NaCl; pH 7.3) до концентрации 1 мг/мл и разливали в пробирки Эппендорф по 300 мкл. Приготовленный таким образом белок помещали на сухой лёд (-78.5°C), а затем переносили и хранили в жидком азоте вплоть до начала экспериментов. 2. Гидрохлорид серотонина (Sigma, USA).

Процедура внутрочерепной инъекции. Перед началом инъектирования карпа выдерживали в течение 2–3 мин в растворе анестетика для рыб MS-222 (130 мг/л), до потери рыбой локомоторной способности. Затем с помощью шприца Гамильтона с ограничителем по стереотаксическим координатам в 4-ый мозговой желудочек медленно (1.5–2 мин) вводили 3 мкл раствора белка или гидрохлорида серотонина. Доза как белка СМАБ, так и серотонина составила 0.3 мкг/г массы тела. Контрольным особям вводили забуференный физиологический раствор для холоднокровных животных тем же способом. После завершения операции отверстие в черепе заделывали с помощью стоматологического цемента, рыбу помещали в ёмкость с чистой водой, где она восстанавливалась от наркоза в течение 3-4 мин. Сразу после окончания инъектирования последней особи рыб помещали в отсек градиента, соответствующий температуре акклимации: опытную группу – в верхний канал установки, контрольную – в нижний. Все инъектированные рыбы выжили и полностью восстановили нормальное поведение и питание.

Распределение рыб в температурном градиенте фиксировали в светлое время суток с помощью видеокамеры. В течение дня проводили 15 наблюдений распределения рыб в отсеках.

Статистическую обработку данных выполняли в программе STATISTICA 6.0 с использованием критерия Стьюдента для сравнения среднесуточных и окончательных значений избираемой температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что белок СМАБ не оказывает воздействия на избираемую температуру у карпов (рис. 1). Так, на протяжении первых трёх суток после инъекции рыб и посадки их в термоградиентную установку динамика ИТ у карпов двух групп совпадает ($p>0.05$): к концу первых суток наблюдения ИТ увеличивается на 5.8-6.4°C (с 17.9 до 23.7±0.4°C и 24.3±0.4°C в контроле и опыте соответственно), а к концу третьих суток – на 9.7°C по сравнению с первоначальной температурой посадки как в контроле, так и в опыте. В дальнейшем (на 4–10-е сут) выбираемый карпами опытной группы диапазон достоверно не изменялся и составил 27.6°C, что позволяет считать это значение окончательной избираемой температурой. Окончательная избираемая температура контрольных рыб в период с 5 по 9-е сутки наблюдения составила 28.6°C. Исключение составил последний день эксперимента, когда среднесуточная избираемая температура резко снизилась до значения 26.7. Однако на наш взгляд, это может быть вызвано неучтенными в эксперименте факторами. Несколько повышенная окончательная избираемая температура контрольной группы по отношению к опытной была достоверна ($p<0.05$) и составила 1°C.

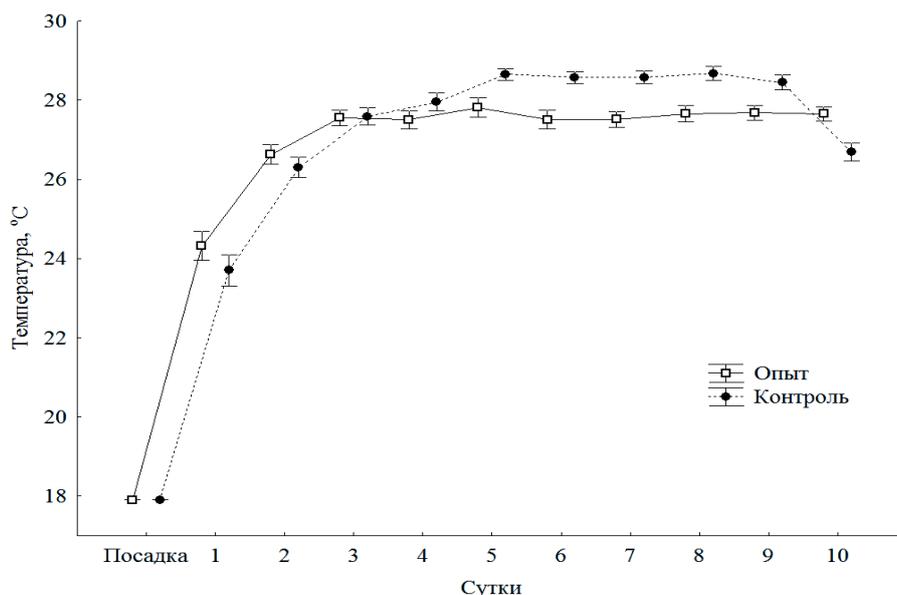


Рис. 1. Динамика среднесуточных избираемых температур у молоди карпа под воздействием серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ)

Наблюдаемые отличия в терморегуляторном поведении карпов под воздействием серотонина гораздо более значительны. Как и в первом эксперименте, сразу после посадки рыб в термоградиентную установку наблюдается значительное возрастание ИТ как в опыте, так и в контроле (на 7°C по сравнению с температурой акклимации). Анализ динамики ИТ выявил достоверный двухфазный эффект серотонина: кратковременное снижение ИТ (2–3-е сут), сменяющееся последующим длительным возрастанием показателя (4–8-е сут). С 8-х по 10-е сутки эксперимента достоверных различий не наблюдалось ($p>0.05$) и окончательная избираемая температура составила 32.4°C. В то же время ИТ карпов контрольной группы увеличиваются вплоть до 4-х суток эксперимента. Затем следует снижение ИТ контрольных рыб на несколько градусов и выход на плато с 7-х по 9-е. Таким образом, окончательная избираемая температура контрольной группы составила 28.3°C. Данное значение хорошо согласуется с полученным в предыдущем эксперименте значением окончательной избираемой температуры (28.6°C). Различия окончательных избираемых температур опытной и контрольной группы были достоверны и составили 4.1°C.

Таким образом, проведённые эксперименты свидетельствуют о несомненном участии экзогенного серотонина в терморегуляторном поведении карпов. Наблюдаемое поведение рыб свидетельствует о постепенно развивающейся гипотермии (снижении температуры тела), что приводит рыб к уходу в более тёплые воды. Этот эффект совпадает с литературными данными, полученными при исследовании млекопитающих.

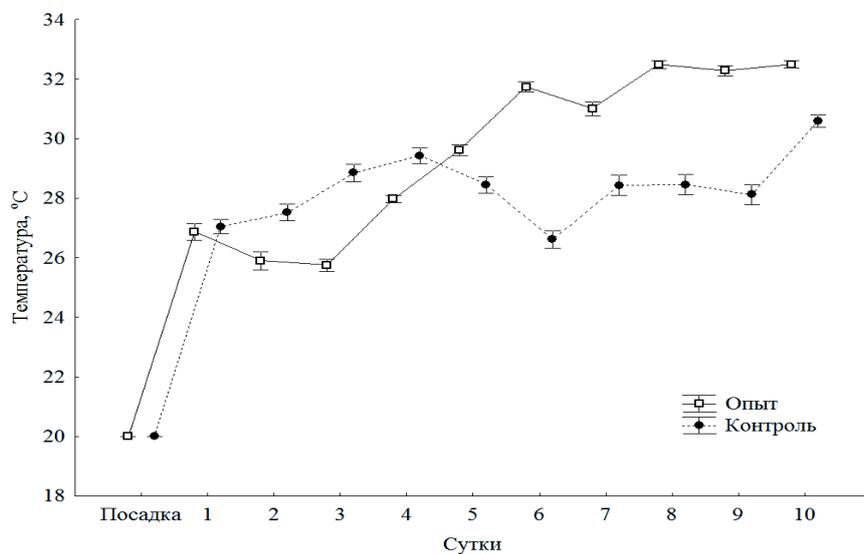


Рис. 2. Динамика среднесуточных избираемых температур у молоди карпа под воздействием серотонина

Показано, что у млекопитающих при развитии гипоксической гипотермии медиаторы серотонин и дофамин понижают температуру тела животного через активацию цАМФ и цГМФ-путей в термоинтегративном центре ЦНС – преоптической области гипоталамуса (ПОГ) (Steiner et al., 2002). Вследствие активации цАМФ-путей возрастает внутриклеточный уровень цАМФ и цГМФ в ПОГ, что, в свою очередь, приводит к увеличению чувствительности теплочувствительных нейронов в ПОГ, ингибированию термогенеза и потере тепла, в результате чего температура тела животного снижается (по: Viscigo et al., 2007). При этом установлено, что данный эффект серотонина частично опосредуется его взаимодействием с рецепторами 5-НТ₁ и 5-НТ₇- типов в ПОГ, активируя образование цАМФ через взаимодействие с Gi-белком (5-НТ₁-рецептор) и Gs-белком (5-НТ₇-рецептор). Мы предполагаем, что увеличение под воздействием серотонина избираемых рыбами температур происходит в соответствии с предложенной для млекопитающих нейробиологической моделью. Следует отметить, что, в отличие от данных других исследователей, наблюдавших значительный гипотермический эффект серотонина на терморегуляционное поведение костистых рыб при его внутримозговом введении уже через несколько минут после инъекции (Tsai et al., 2002), мы наблюдали развитие эффекта довольно поздно, на 4-е сутки после инъекции, что, возможно, связано с введением препарата не

непосредственно в гипоталамус, а в 4-ый желудочек, расположенный в области заднего мозга. Величина и продолжительность эффекта может зависеть также от внешних факторов среды, в частности, от предварительной температуры акклимации рыб, как было показано нами в эксперименте с потреблением рыбами корма, содержащего флуоксетин (препарата, увеличивающего содержание серотонина в синапсах нейронов мозга) (Гарина, Смирнов, 2012).

Вместе с тем, мы не наблюдали в нашем исследовании значительного влияния белка СМАБ на избираемые температуры у карпов, как это происходило под влиянием серотонина. В качестве рабочей гипотезы, можно предположить, что СМАБ имеет более прологированный и отсроченный эффект на терморегуляторные процессы, чем серотонин, и этот эффект можно было бы выявить в более длительном эксперименте. Однако также можно допустить, что СМАБ не участвует в терморегуляции у рыб, и что выявленные эффекты серотонина в нейронах гипоталамуса могут реализоваться посредством другого серотонин-модулируемого белка. Данная гипотеза требует проведения дополнительных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахшалиева Р.Р., Мехтиев А.А., Касимов Р.Ю. Участие серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка в опосредовании воздействия неблагоприятных факторов на уровень перекисного окисления липидов в тканях молоди осетра *Acipenser guldenstadti persicus* // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2010. Т. 46, № 5. С. 370–374.
2. Гарина Д.В., Смирнов А.К. Влияние серотонинотропного препарата флуоксетина на избираемую температуру у молоди плотвы *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes), акклимированной к разной температуре // Вопр. ихтиол. 2012. № 4. С.
3. Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами // Бюлл. экспер. биол. мед. 2000. Т. 129, № 8. С. 147–150.
4. Мехтиев А.А., Мовсум-заде С.К. Антимутагенная активность серотонинергической системы и подлежащие механизмы у молоди осетра и серебряного карася // Ж. эвол. биохим. и физиол. 2008. Т. 44, № 5. С. 476–481.
5. Мустафаев Н.Дж., Мехтиев А.А. Изменение серотонинергической активности в тканях рыб при увеличении солёности воды // Ж.эвол.биохим. и физиол. 2008. Т. 44, № 1. С. 69–73.
6. Vitego K.C., Barros R.C.H., Branco L.G.S. Physiology of temperature regulation: comparative aspects // Comp. Biochem. Physiol. A. 2007. V. 147. P. 616–639.
7. Block B.A. Thermogenesis in muscle // Annu. Rev. Physiol. 1994. V. 56. P. 535–577.
8. Steiner A.A., Rocha M.J.A., Branco L.G.S. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2002. V. 283. P.1412–1422.
9. Tsai Ch.-L., Wang L.-H. Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters, serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus* // Neurosci. Lett. 1997. V. 233. P. 77–80.
10. Tsai Ch.-L., Wang L.-H., Tsai Ch.-Ch. Role of serotonin, γ -aminobutyric acid, and glutamate in the behavioral thermoregulation of female tilapia during the prespawning phase // J. Exp. Zool. 2002. V. 293. P. 443–449.

THE ROLE OF SEROTONINERGIC BRAIN SYSTEM AND ITS COMPONENT, SEROTONIN-MODULATING ANTICONSOLIDATION PROTEIN IN THERMOREGULATIVE BEHAVIOR OF CARP *CYPRINUS CARPIO*

D.V. Garina*, A.K. Smirnov*, V.V. Kuz'mina*, A.A. Mekhtiev**

* I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Yaroslavl, Russia

**A.I. Karaev Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku

E-mail: garinadv@mail.ru

The effects of intracerebroventricular injection of serotonin (5-HT) and serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP) on thermoregulative behavior of carps *Cyprinus carpio* have been investigated in two long-term experiments. It was shown that 5-HT at the dose 0.3 $\mu\text{g/g}$ caused delayed hypothermic response - significant increasing of preferred and ultimate preferred temperature (on 4.1 degree) which was observing on 4-10 days after an injection. The ICV-injection of SMAP wasn't influencing significantly on preferred temperatures of carps during all period of the observation. It was concluded that 5-HT only not SMAP participates in thermoregulative behavior of carps. It was proposed that action of serotonin on fish body temperature is conditioned by its interaction with serotonin receptors in thermoregulative center of hypothalamus and as a result by changing of concentration of secondary messengers, cAMP and cGMP, in compliance with the neurochemical model described in mammals.

БЕЛОК WNT5 ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОСЛЕ ЭВИСЦЕРАЦИИ У ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX*

А.С. Гирич^{1,2}, И.Ю. Долматов^{1,2}, Н.Е. Ламаш^{1,2}, М.Г. Елисейкина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 690059, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17

² Дальневосточный федеральный университет, 690950, Владивосток, ул. Суханова, д. 8, E-mail: astromoon89@gmail.ru

Регенерация, или способность к восстановлению поврежденных или утраченных структур, свойственна в той или иной мере всем живым организмам. Она является универсальной адаптацией к повреждающему действию окружающей среды. Среди беспозвоночных представители типа Echinodermata выделяются своими способностями к регенерации. В частности, голотурии, или морские огурцы, могут выбрасывать (эвисцерировать) кишечник, а затем, в течение 3-4 недель полностью его восстановить (Долматов, Машанов, 2007). В этой связи иглокожие являются хорошими модельными объектами для изучения различных аспектов регенерации. В последнее время уделяется большое внимание молекулярным механизмам восстановительных морфогенезов. Исследования показали, что одним из важных регуляторов регенерации является сигнальная система Wnt (Kawakam et al., 2006). Продукты генов семейства Wnt являются лигандами и запускают проведение сигнала как по каноническому пути, с использованием β -катенина, так и по неканоническому пути за счет взаимодействия с ионами Ca^{2+} (Komiyu et al. 2008). Помимо регенерации сигнальный путь Wnt играет большую роль в регуляции эмбрионального развития, а также в формировании различных раковых образований. Активная экспрессия Wnt усиливает регенеративную способность у рыб и амфибий (Kawakam et al., 2006).

В этой связи нами была предпринята попытка изучить роль одного из членов данного семейства, гена *Wnt5*, при регенерации у иглокожих. Исследование проводилось на голотурии *Eupentacta fraudatrix*, обитающей в Японском море. Данный вид способен к одной из редких форм аутомии, эвисцерации, при которой удаляются почти все внутренние органы (пищеварительная система и аквафарингеальный комплекс (АК)). С помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF у *E. fraudatrix* были идентифицированы два белковых фрагмента, гомологичных разным частям молекулы Wnt5 морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*, а также имеющих в своем составе последовательность, характерную для Wnt5. Был синтезирован искусственный пептид и на него были получены поликлональные антитела, с помощью которых проводился анализ локализации белка Wnt5 в тканях голотурии.

У неповрежденных голотурий Wnt5 присутствует в немногочисленных округлых клетках, расположенных в соединительной ткани внутренних органов (Рис. 1), в частности под эпителием радиальных амбулакральных каналов и в стенке тела около радиальных нервных тяжей. Кроме того, белок Wnt5 обнаруживается в отростках клеток эпинеуральной части нервной системы.

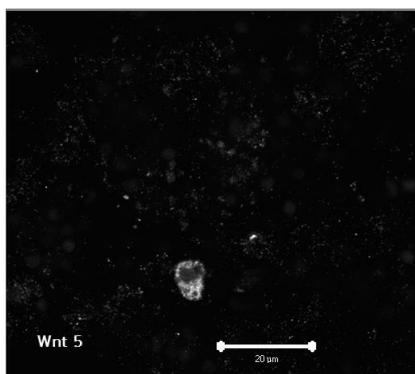


Рис. 1. Клетка, содержащая белок Wnt5, в соединительной ткани неповрежденной голотурии *Eupentacta fraudatrix* (длинная стрелка). Короткими стрелками указаны ядра, окрашенные DAPI.

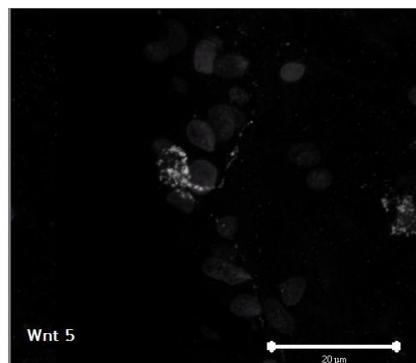


Рис.2. Отростчатая клетка, содержащая белок Wnt5, в соединительной ткани голотурии *Eupentacta fraudatrix* на 7 сут регенерации. Стрелками отмечены ядра, окрашенные DAPI.

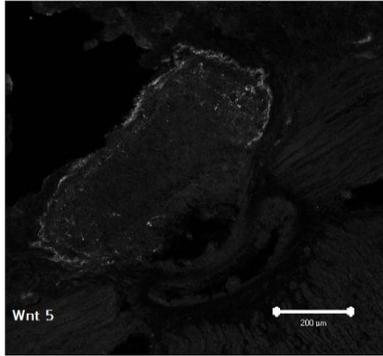


Рис. 3. Радиальный нервный тяж *Eupentacta fraudatrix*, на 7 сут регенерации. А – амбулакральный канал, Г – гемальный сосуд, М – мышца, Н – радиальный нервный тяж, С – соединительная ткань.

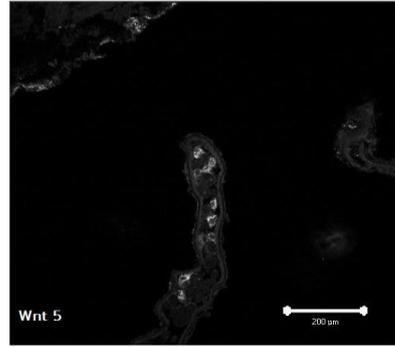


Рис. 4. Амбулакральный сосуд *Eupentacta fraudatrix* на 13 сут регенерации, содержащий Wnt5-положительные целомоциты.

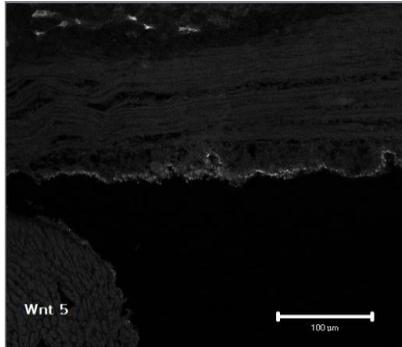


Рис. 5. Целомический эпителий *Eupentacta fraudatrix*, на 13 сут регенерации. С – соединительная ткань, Ц – целомический эпителий.

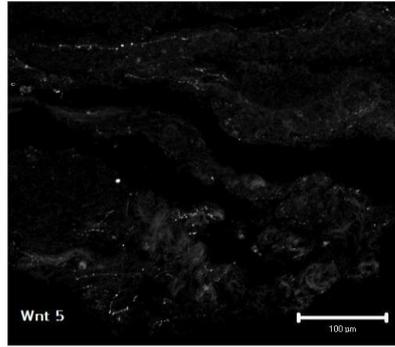


Рис. 6. Мезентерий *Eupentacta fraudatrix* на 7 сут регенерации.

В процессе регенерации число клеток с гранулами исследуемого белка в соединительной ткани увеличивается. Также изменяется форма клеток: они вытягиваются и формируют отростки, что, вероятно, свидетельствует об их миграции (Рис. 2). Количество белка Wnt5 в отростках клеток нервного тяжа также увеличивается (Рис. 3). Кроме того, клетки, содержащие в цитоплазме гранулы Wnt5, появляются в зачатке АК и в каналах амбулакральной системы (Рис. 4). В дальнейшем Wnt5-положительные клетки обнаруживаются в целомическом эпителии, выстилающем полость тела (Рис. 5) и кишечном мезентерии, на котором формируется кишечник (Рис. 6).

Наличие Wnt5-положительных клеток у неповрежденных голотурий показывает, что Wnt5 участвует в нормальной жизнедеятельности *E. fraudatrix*. Он, вероятно, синтезируется небольшим числом клеток, расположенных в соединительной ткани. Такое распределение указывает на то, что основная функция Wnt5 у голотурий, как и у других животных, связана с преобразованием внеклеточного матрикса или изменением его свойств (Гилберт, 1995).

Восстановительный процесс после эвисцерации характеризуется активной клеточной миграцией (Долматов, Машанов, 2007). В числе прочих в область раны перемещаются и Wnt5-положительные клетки. Они скапливаются в зачатках органов и, вероятно, стимулируют миграцию других клеток. Сходный процесс наблюдается у позвоночных при развитии некоторых видов опухолей. Wnt5 воздействует на раковые клетки, активируя процесс их миграции, что приводит к появлению метастазов (Witze et al., 2008). Подобным образом действуют и другие члены семейства Wnt, например Wnt11, который регулирует клеточную подвижность через неканонический сигнальный путь (Debeir et al., 2008). У *E. fraudatrix* количество клеток, синтезирующих Wnt5, увеличивается в процессе регенерации, что способствует более активной миграции. Возможно клетки, производящие белок Wnt5, активируют процесс миграции у себя и близлежащих клеток (Witze et al., 2008). Кроме того,

Wnt5, вероятно, может действовать через амбулакральную систему, достигая клеток мишеней. На это указывает наличие Wnt5-положительных целомочитов в амбулакральных каналах. Амбулакральная система является, по сути, единственной транспортной системой иглокожих, поэтому расположение здесь клеток, синтезирующих Wnt5, закономерно.

Большое значение в регенерации АК и кишки у голотурий играет преобразование внеклеточного матрикса (Quiñones et al., 2002; Долматов, Машанов, 2007). Изменение свойств соединительной ткани также может опосредоваться генами семейства Wnt. В частности, было показано, что они могут активировать экспрессию генов матричных металлопротеиназ (ММП) (Wu et al., 2007). Продуктами этих генов являются ферменты, способные расщеплять отдельные компоненты внеклеточного матрикса. Активация трех различных ММП (ММП1, ММП14, ММП16) была отмечена и при регенерации голотурий *H. glaberrima* и *E. fraudatrix* (Ortiz-Pineda et al., 2009; Долматов и др., в печати). Изменение плотности внеклеточного матрикса облегчает миграцию клеток и способствует восстановительному процессу.

Работа выполнена при поддержке грантов Правительства России (№ 11.G34.31.0010) и Российского фонда фундаментальных исследований (№11-04-00408).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гилберт С. Биология развития // Т. 3: Пер. с англ. М.: Мир, 1995. 352с.
2. Долматов И.Ю., Машанов В.С. Регенерация у голотурий // Владивосток: Дальнаука. 2007. 212 с.
3. Models of cancer cell migration and cellular imaging and analysis / Debeir O., Adanja I., Kiss R., Decaestecker C. // Transworld Research Netwok. 2008. V. 37(661). P. 129.
4. Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration / Kawakam Y., Conception R. E., Raya M., et al. // Genes and development. 2006. V. 20. P. 3232–3237.
5. Komiya Y., Habs R. Wnt signal transduction pathways // Landes Bioscience. 2008. V. 4. P. 68-75.
6. Ortiz-Pineda P. A, Ramirez-Gomez F., Petez-Ortiz J. et al. Gene expression profiling of intestinal regeneration in sea cucumber // BMC Genomics. 2009. V. 10:262. P. 1-21.
7. Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* / Quiñones JL., Rosa R, Ruiz D, García-Arrarás JE. // Dev. Biol. 2002 V. 250. P. 181-197.
8. Wnt5a Control of Cell Polarity and Directional Movement by Polarized Redistribution of Adhesion Receptors / Witze E. S., Litman E. S., Argast G. M., et al. // Science. 2008. V. 320. P. 365–369.
9. Wu B., Crampton S. P., Hughes C.W. Wnt signaling induces MMP expression and regulates T cell transmigration // Immunity. 2007. V. 26(2). P. 227–239.

WNT5 EXPRESSION DURING REGENERATION AFTER EVISCERATION IN HOLOTHURIAN *EUPENTACTA FRAUDATRIX*.

A.S. Girich, I.Y. Dolmatov, N.E. Lamash, M.G. Eleseikina

A lot of Echinodermata representatives have good regenerative ability. An example of internal organs regeneration may be holothurians, that can eject (eviscerate) intestine with different organs, and within 2-3 weeks fully restore the digestive system. In this regard, Echinoderms are a good model for the study of different regeneration aspects. Recently much attention have been paying to molecular mechanisms of reparative morphogenesis. Wnt genes family present such morphogenes. Wnt proteins are ligands that initiate three different signaling pathways: canonical, Planar Cell Polarity (PCP) way and Wnt/Calcium pathways. Wnt proteins play an important role in different morphogenetic processes, embryogenesis, regeneration and cancer formation. We have attempted to find Wnt5 protein localizations in at echinoderm regeneration. The research has been made on holothurian *Eupentacta fraudatrix*. This animal can regenerate the digestive system and pharyngeal bulb after evisceration. The sequence of *E. fraudatrix* Wnt5 acid has been identified by MALDI-TOF method. Synthetic protein has been synthesized and then polyclonal antibody has been obtained.

In undamaged *E. fraudatrix* a little Wnt5 positive cells are located in connective tissue of some internal organs. During the regeneration the number of these cells increases. Wnt5 positive cells are observed in body wall connective tissue, intestinal mesentery, regenerating intestine. Moreover Wnt5 gene expression has been observed in nerve cords of body wall and regenerating pharyngeal bulb. Also cells with Wnt5 granules can be found in water-vascular canals. The obtained data suggest that Wnt5 protein localizes in connective tissue cells, probably in fibroblasts and coelomocytes and play a special role in extracellular matrix changes and direction of cells migration during regeneration in *E. fraudatrix*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АКВАРИУМНЫЕ СИСТЕМЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИЙ ЭНДЕМИЧНЫХ ГИДРОБИОНТОВ.

Глызина О.Ю.¹, Суханова Л.В.¹, Сапожникова Ю.П.¹, Смирнов В.В.²,
Смирнова-Залуми Н.С.¹, Глызин А.В.¹, Тягун М.Л.¹, Зайцева А.А.¹, Беломестных Т.А.¹

¹*Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия*

²*Байкальский музей ИИЦ СО РАН, Листвянка, Россия*

e-mail: jsap@mail.ru

2005-2015 годы объявлены ООН десятилетием «Вода для жизни». Озеро Байкал и его эндемичные гидробионты - предмет значительного числа научных трудов отечественных и зарубежных учёных (Masuda, 1999; Тимошкин, 2011; Государственный доклад, 2012). Необычайное богатство видов оз. Байкал привело к тому, что основной упор в исследованиях при изучении биоты озера приходится на работы систематико-фаунистического направления. При этом аспекты экологической физиологии и биохимии байкальских гидробионтов оставались до последнего времени практически не изученными, что было связано с отсутствием необходимой лабораторной базы и разработанных методов длительного содержания эндемичных байкальских гидробионтов в искусственных условиях. Исследования подобного рода на морских гидробионтах приобретают особую актуальность в связи с загрязнением мирового океана. С созданием в 2005 году живой экспозиции при Байкальском музее СО РАН и в 2009 году экспериментального аквариумного комплекса при Лимнологическом институте СО РАН (Глызин, 2011) появилась возможность проведения более глубоких исследований экологии эндемичных байкальских гидробионтов.

Целью первых работ, проведенных с использованием уникальной аквариумной системы нового поколения, была разработка научных основ культивирования байкальских эндемичных гидробионтов. При этом мониторинг за состоянием организмов проводился с помощью современных молекулярно-генетических, эколого-биологических и биохимических методов в условиях многокомпонентных искусственных экосистем.

При этом были поставлены следующие задачи: выявить экологические особенности байкальских эндемичных гидробионтов в условиях искусственного содержания; оценить влияние основных факторов среды на организмы; оптимизировать условия культивирования байкальских эндемичных гидробионтов в проточных аквариумных системах; выявить наиболее высокочувствительные информативные изменения в гидробионтах и создать на их основе тест системы для биологического мониторинга; модернизировать экспериментальные аквасистемы.

Работы проводились как в пресноводном аквариумном комплексе при Лимнологическом институте СО РАН, так и в живой экспозиции и аквариальной при Байкальском музее СО РАН. Экспериментальные аквариумные установки были представлены тремя группами: аквариумная система (АС) открытого проточного типа, непосредственно связанная с озером Байкал; АС замкнутого проточного типа, которая связана с озером Байкал, но может работать как изолированная установка; АС непроточного типа, состоящая из группы аквариумов – биореакторов для адаптации гидробионтов и проведения сложных экспериментов, требующих стерильности или полной изоляции организмов. Все три аквариумные системы повторяют друг друга за исключением объемов аквариумов и условий проточности. В целом, АС можно описать как систему термостатированных камер с набором вспомогательного оборудования (модуль вывода дискретных сигналов; модуль ввода аналоговых сигналов, поворотный механизм для установок на краны подачи воды; привод регулирования потока, АРС сервер, сервер для объединения работы датчиков; устройства согласования функций вывода и ввода; датчик измерения pH; SO-100 измеритель окислительно-восстановительного потенциала; автоматическая система управления освещением и температурой; устройство управления выводом 8 релейных каналов; устройство ввода 8 аналоговых сигналов; термодатчик ПО для SCADA; счетчик расхода воды; ОВП метр; датчики PH для программирования контроллеров; источники бесперебойного питания 2000ва и 1000ва; перистальтический насос). Для поддержания в аквариумах пониженной температуры +2-12°C при отсутствии проточности использовался прибор ТРМ202 («Овен», Россия), регулирующий с помощью электромагнитного клапана поток холодной водопроводной воды в теплообменник. В качестве

источников света использовали фотолюминесцентные светильники или лампы, которые обеспечивали освещение по параметрам конкретного эксперимента. Режим освещения день-ночь обеспечивали таймером УТ1-Рис («Овен», Россия). Освещенность составляла в среднем $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, что соответствует световому режиму для байкальских водорослей как элементов первичной продукции озера. Воду в аквариумах барботировали пропущенным через фильтр сжатым воздухом при замкнутых циклах. При открытой проточной системе аквариумов воду не фильтровали. Для изучения поведения и циклов развития животных была использована современная видеоаппаратура с круглосуточным наблюдением за объектами. Для инкубации икры была использована специально разработанная для целей эксперимента инкубационная установка, представляющая собой систему уменьшенных копий аппарата Вейса, обычно используемого для инкубации икры сиговых в производственных масштабах.

Организмы для содержания, культивирования и изучения (губки и рыбы, результаты исследования которых описаны в данной статье) отбирались в разные периоды их жизненного цикла с учётом районов взятия проб, сезонов, морфо-экологических и других характеристик. Учитывался период адаптации организмов к новым искусственным условиям обитания. При этом исследования проводились с использованием специально созданных авторами аквариумных установок с регулируемым температурным, световым и химическим режимом среды. Всё вышеперечисленное позволило ставить эксперименты по влиянию различных абиотических факторов на адаптационные реакции изучаемых гидробионтов.

Для выявления морфологических особенностей объектов исследования применялись классические и современные методы, включая методы электронной микроскопии. При проведении биохимических исследований гидробионтов были использованы современные методы определения состава организмов (микроколониальная и препаративная жидкостная хроматография с одновременной многоволновой фотометрической детекцией, с высоковоспроизводимым градиентным режимом элюирования, пригодным для проведения экспресс-анализа в полевых условиях). Для оценки минорных компонентов в исследуемых пробах использовали методы газо-жидкостной и препаративной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Более высокая чувствительность микроколониального хроматографа и тандема ЖХ-МС по сравнению со стандартным хроматографическим оборудованием позволила работать с меньшим количеством образца.

Экспериментальные работы по культивированию байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1771) дали важный результат, позволяющий создать методику, в основу которой может быть положена диагностика состава маркерных жирных кислот клеток губок и хлорофиллов симбиотических водорослей в сложном симбиотическом сообществе, которым является губка. Методика позволит отследить смену роли типа питания (автотрофного и гетеротрофного) у губки, которая длительно содержится в аквариуме и визуально выглядит здоровой.

В ходе работ впервые были проведены эксперименты по искусственной гибридизации байкальского озерного сига *Coregonus baicalensis* и омуля *Coregonus migratorius* с последующей инкубацией икры и выращиванию рыб в идентичных условиях. Полученные коллекции живых особей (гибридов F1 и чистых линий омуля и озерного сига) планируется в дальнейшем использовать в возвратных скрещиваниях для биохимического анализа и в исследованиях по сравнительной функциональной геномике байкальских сиговых рыб (заинтересованных исследователей приглашаем в наш коллектив).

При исследовании развития в онтогенезе абсолютной и дифференциальной акустической чувствительности байкальского омуля эксперименты проводили с отловленными из озера Байкал одиночными половозрелыми особями байкальского омуля посольской популяции, а также молодь в возрасте 4 недель (личинки) и 20 недель (мальки) после выклева. В ходе эксперимента отмечена способность половозрелого омуля к дифференциальной чувствительности - возможности различать звуки близкой частоты, в частности в диапазоне низких частот – от 400 до 1000 Гц. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем изучении акустической коммуникации байкальского омуля разных популяций. Зафиксировано также значительное увеличение активности и уменьшение плотности особей байкальского омуля при звуковом воздействии в отличии с их активностью и плотностью при отсутствии звука. В дальнейшем опыты по поведению и акустической чувствительности

байкальского омуля будут проводиться на гибридах F1 и чистых линиях омуля и озерного сига, полученных в условиях АС.

В течение пятимесячного эксперимента нами было проведено исследование отоликов гибридов омуля и сига («самка-омуль + самец-сиг» и «самец-сиг + самка-омуль»), содержащихся в искусственных условиях. Отмечено, что, несмотря на различия в росте и размерах, в периодиках приростов отоликов на стадиях малька и сеголетка во всех экспериментальных группах наблюдается преобладание опавых приростов. По этому факту можно предположить, что глубинные механизмы, связанные с обменом веществ в летнем сезоне у сиговых неизменны.

Впервые был поставлен эксперимент по исследованию гонадо- и гаметогенеза в раннем онтогенезе черного байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baicalensis*), данные по которому до настоящего времени отсутствовали. Объектом исследования послужили мальки и личинки этого вида. Исходный материал получили от одной самки в день выклева. Результаты эксперимента показали, что у черного хариуса анализируемых возрастов половые железы в течение 90 суток были индифферентными. В возрасте 111 дней после выклева у 60% особей наблюдается превителлогенез (начало развития женских половых клеток). В дальнейшем планируется исследовать развитие репродуктивной системы у старших возрастных групп чёрного байкальского хариуса.

Проведённые в АС исследования позволят в дальнейшем ставить комплексные эксперименты, трудноосуществимые в естественных условиях, с использованием таких новейших современных методов изучения гидробионтов, как методы молекулярной биологии, биохимического анализа, электронной микроскопии и видеонаблюдения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Masuda Y., Itskovich V.B., Weinberg E.V., Efremova S.M. A study of the vertical distribution of freshwater sponges in the littoral zone of Lake Baikal// Biodiversity, Phylogeny and Environmental. 1999. P. 25-34.
2. Тимошкин О.А. и др. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск: Наука. 2011. 1668 с.
3. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2010 году», Министерство Природных Ресурсов и Экологии Российской Федерации, 2012.
4. Глызин А.В., Глызина О.Ю., Любочко С.А. Изучение байкальских гидросимбионтов с помощью экспериментальных аквариумных установок// Вода: химия и экология. 2011. № 2. С. 35-40.

THE EXPERIMENTAL AQUARIUM SYSTEMS AS A BASIS FOR STUDYING PHYSIOLOGICAL AND-BIOCHEMICAL ADAPTIVE MECHANISMS OF ENDEMIC HYDROBIONTS

Glyzina O.Yu.¹, Sukhanova L.V.¹, Sapozhnikova Yu.P.¹, Smirnov V.V.², Smirnova-Zalumi N.S.¹, Glyzin A.V.¹, M.L. Tyagin¹, V.M. Yakhnenko¹, A.A. Zaitceva¹, T.A. Belomestnych¹

The cold-freshwater aquarium complex, which is located at Limnological Institute and Baikal Museum of the Irkutsk scientific center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, is aimed at performing experimental survey on revealing regularities of the Lake Baikal ecosystem functioning. Cultivation of both cosmopolitan and endemic Baikal hydrobionts and their investigations are carried out using a unique aquarium system and up-to-date molecular-genetic, ecobiological, physical and biochemical methods under conditions of multicomponent artificial ecosystems.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ПРЕСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ И ИХ ДЕТЕРМИНАЦИЯ

Л.Л. Гнатишина, Г.И. Фальфушинская, А.Е. Мудра, О.А. Турта, О.И. Горин, Я.В. Бажура,
О.Б. Столяр

Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка,
Тернополь, Украина

e-mail:lesyafoxy@i.ua, www.biochemlab.tnpu.edu.ua

Металл-депонирующие белки металлотioneины (МТ) свойственны большинству животных и одноклеточных и ген-детерминированы у растений. Свойства МТ и их реакция на действие неблагоприятных факторов среды характеризуются широким спектром проявлений, закономерности которых не систематизированы в зависимости от филогенетического положения организма и природы действующего фактора (Viarengo et al., 2007, Stoliar and Falfushynska, 2011). Рекомендации по использованию МТ водных животных в качестве биомаркера токсичности среды разграничивают реакцию этих белков у рыб как наиболее вероятный ответ на стрессорное воздействие, и у моллюсков, как реакцию на токсичность металлов (Valls et al., 2001). При этом оценка их состояния сводится к определению одной из характеристик: концентрации белка МТ по тиолам (МТ-SH) или металлу (МТ-Me), или же экспрессии генов *mt*.

Целью нашего исследования стало оценить функциональные возможности МТ пресноводных животных исходя из их реакционной способности. Экземпляры двустворчатого моллюска беззубки *Anodonta anatina*, рыбы карася серебристого *Carassius auratus gibelio* и лягушки озерной *Rana ridibunda* вылавливали в условно чистой (И) и загрязненной (Б) местностях. МТ из печени рыбы и лягушки и пищеварительной железы моллюска выделяли методом гель-хроматографии на сефадексе G-50. Определяли состав металлов (цинк, медь, кадмий) в МТ и ткани, содержание МТ по количеству связанных с ними металлов (МТ-Me), содержанию тиолов (МТ-SH), а также иммуноферментным методом (ELISA, у рыб). Выделяли отдельные домены МТ путем частичного гидролиза субтилизином реконструированных гомометаллических МТ. В качестве окислительного агента использовали пероксид водорода (0,5 и 5мМ). Титрование SH-групп проводили с помощью дитионитробензойной кислоты (ДТНБ). Детальное описание методик приведено в работах Фальфушинска с соавт. (Falfushynska et al., 2008, 2010а, 2011, 2012). В лабораторных условиях изучали МТ после воздействия ионов меди (0,005, 0,01 и 0,05 мг/л), цинка (0,15 мг/л), марганца (0,17 и 1,7 мг/л), кадмия (0,015 мг/л), тиокарбаматного (ТАТТУ, 0,0091 и 0,091 мг/л) и тетразинового (Аполло, 0,002 и 0,01 мг/л) фунгицидов, кобальта (0,05 мг/л) и кобальт-содержащего наноматериала (Co-НМ, 0,05 мг/л по кобальту) на животных на протяжении 14 суток.

МТ исследуемых видов являются низкомолекулярными термостабильными белки с молекулярной массой (М) около 7 кДа и характерным УФ-спектром поглощения, в котором присутствует максимум при 254 нм и отсутствует максимум при 280 нм (Рис. 1). При хроматографии на сефадексе G-50 термостабильных белков моллюска выявляются дополнительные фракции (4, 12 и 16 кДа), особенно в группе Б и при воздействии Co-НМ. У лягушки была отмечена фракция с М 12 кДа при действии ионов меди (Falfushynska et al., 2010с). Наименее выражена гетерогенность форм у карася.

Идентификация дополнительных фракций показала, что они по хроматографическому поведению и УФ-спектрам соответствуют продуктам частичного гидролиза МТ (α - и β -домены и продукты их окисления). Причем МТ-12 является продуктом окисления Cu - β -домена, а МТ-16 – Cd - α -домена, то есть специфическими продуктами их олигомеризации (Рис. 1).

Известно, что МТ могут быть продуктами экспрессии конституционных и индуцибельных генов, причем у моллюсков, в отличие от рыб, они отличаются по массе (Viarengo et al., 2007; Lee et al., 2010). Поэтому представляло интерес определить природу гетерогенности белков МТ. Титрование в условиях реакции псевдопервого порядка при избытке ДТНБ показало, что кинетические константы доменов МТ моллюска мало отличаются между собой, у карася реактивность α -домена значительно выше, чем β -домена, а у лягушки, наоборот, что является результатом повышенной чувствительности β -домена к окислению (Рис. 1). По уменьшению чувствительности к действию окисляющих факторов формы МТ исследуемых видов

располагаются в ряду α -МТ карася > β -МТ беззубки > β -МТ лягушки. МТ лягушки наиболее легко теряют способность к связыванию ионов меди и, особенно, цинка.

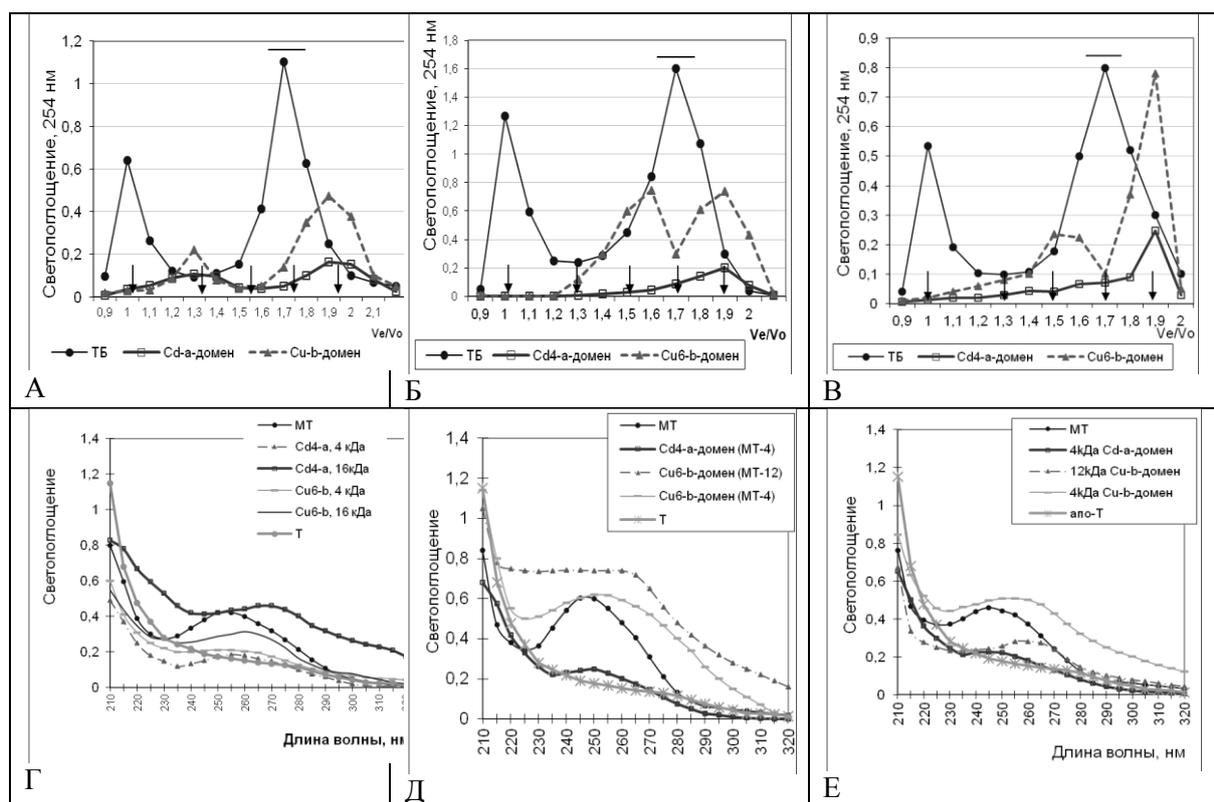


Рис. 1. Типичные профили элюции термостабильных белков и продуктов частичного гидролиза металлотионеинов печени карася (А), лягушки (Б) и пищеварительной железы беззубки (В) при хроматографии на сефадексе G-50 и соответствующие УФ-спектры (Г-Е).

По составу металлов и соотношению содержания металла в составе МТ и ткани наблюдаются существенные различия между видами. В составе МТ карася преобладает цинк, что типично для α/β -МТ позвоночных животных (Valls et al., 2001), а для МТ лягушки характерно относительно высокое содержание меди. В МТ беззубки преобладает цинк (Табл.). Относительная способность связывать цинк в ткани уменьшается в ряду *Carassius auratus gibelio* > *Rana ridibunda* > *Anodonta anatina*, а меди – *Anodonta anatina* > *Carassius auratus gibelio* > *Rana ridibunda*. Таким образом, Zn-МТ карася обеспечивают наиболее эффективное связывание цинка в ткани, Cu-МТ лягушки наименее эффективно связывают соответствующий металл, а Zn-МТ беззубки являются более эффективным депо для меди, чем для цинка.

Таблица. Типичное содержание металлов в составе металлотионеинов (нмоль/г ткани) и их доля от общего содержания металла в ткани (%; диапазон в различных условиях существования) водных животных, $M \pm m$, $n=8$ (по данным Falfushynska et al., 2008, 2010a,b,c, 2011, 2012).

| Вид | Медь | Цинк | Кадмий | Zn:Cu:Cd |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
| <i>Carassius auratus gibelio</i> | 20,8±2,9 (18-48%) | 108,9±11,7 (0,5-25%) | 6,9±0,9 (60-90%) | 14,0 : 2,5 : 1,0 |
| <i>Rana ridibunda</i> | 39,0±3,5 (1-3%) | 88,1±8,4 (6-10%) | 8,9±0,7 (75-100%) | 9,9 : 4,4 : 1,0 |
| <i>Anodonta anatina</i> | 14,1±2,1 (1,6-57%) | 161,5±17,3 (0,4-13,3%) | 16,1±2,4 (9,1-75,0%) | 11,5 : 1,1 : 1,0 |

В условиях токсичной среды обитания и при действии модельных неблагоприятных факторов общее содержание МТ-SH и МТ-Ме в тканях карася из чистой местности возрастает, причем согласованно. Методом регрессионного анализа данных для экземпляров из природных

популяций установлена зависимость: $f(\text{MT-SH})_{\text{печень}} = -485,472 + 106,25\text{Cu}(\text{MT})^* - 5,841\text{Zn}(\text{MT})^* - 71,874\text{Cd}(\text{MT})^*$, (где * вклад показателя в регрессионную модель достоверный, $p < 0,001$). При этом, содержание иммунореактивной конститутивной формы МТ у карася уменьшается, что свидетельствует об усилении экспрессии индуцибельной формы МТ (Lee et al., 2010). Для беззубки и лягушки такая зависимость отсутствует, вероятно, вследствие легкой окисляемости SH-групп доменов МТ. У моллюсков в токсической среде уменьшается содержание МТ-SH, а у лягушки – МТ-Me.

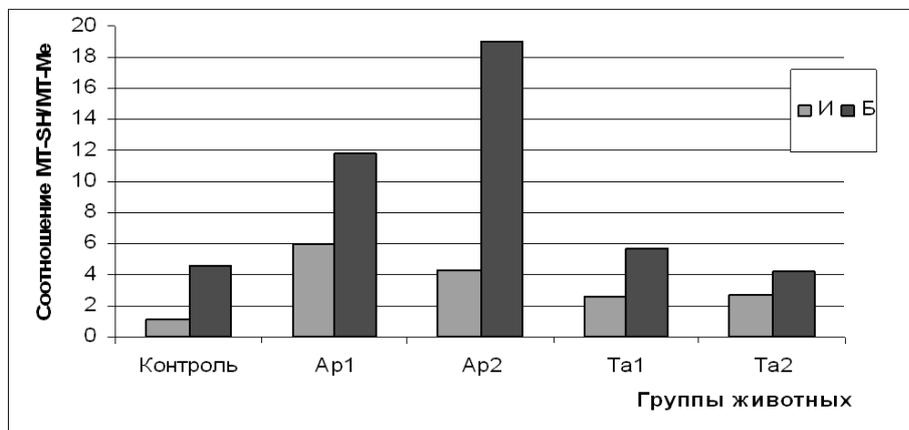


Рис. 2. Соотношение общего содержания металлотионеинов (MT-SH) и их металл-депонирующей формы (MT-Me) в печени карася из двух водоемов (И и Б) после действия на рыб двух концентраций фунгицидов Аполло (Ap) или ТАТТу (Ta).

Для представителей разных видов из загрязненной местности при действии дополнительного неблагоприятного фактора наблюдается общая закономерность – эффект избегания, то есть уменьшается содержание металлов в ткани и в составе МТ, даже если действующим фактором были ионы металла. При этом, у карася увеличивается антиоксидантный потенциал МТ (MT-SH), а у беззубки и лягушки изменения MT-Me и MT-SH происходят несогласованно, что подтверждается факторным анализом результатов изучения биомаркеров в тканях этих животных (Рис. 2). Таким образом, МТ карася в условиях постоянного действия субтоксической среды обеспечивают антиоксидантный потенциал организма, а легко окисляемые МТ беззубки и лягушки не в состоянии обеспечивать адекватную адаптацию к воздействию неблагоприятных факторов (Рис. 3).

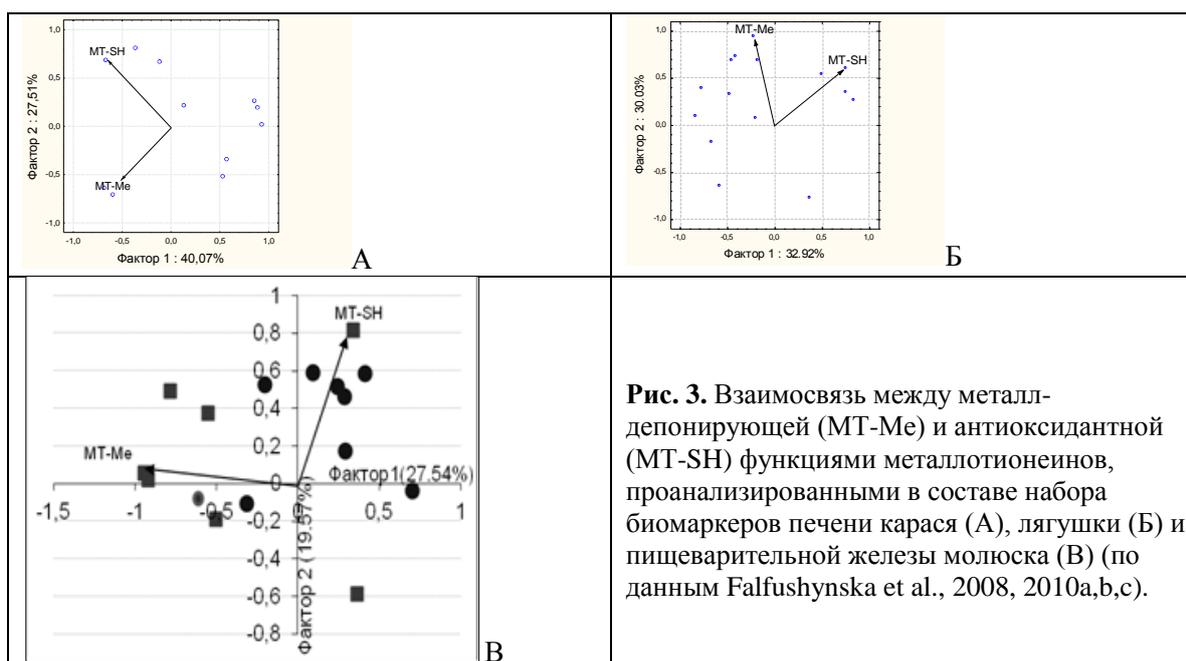


Рис. 3. Взаимосвязь между металл-депонирующей (MT-Me) и антиоксидантной (MT-SH) функциями металлотионеинов, проанализированными в составе набора биомаркеров печени карася (А), лягушки (Б) и пищеварительной железы моллюска (В) (по данным Falfushynska et al., 2008, 2010a,b,c).

Можно заключить, что в соответствии с филогенетически обусловленными приоритетами в обеспечении гомеостаза цинка или меди способность МТ обратимо связывать ионы металлов и поддерживать редокс-состояние SH-групп может существенно отличаться. Очевидно, α -домен МТ в силу большей лабильности связей обеспечивает облегченный обмен ионами цинка с другими его клеточными лигандами, особенно у рыб, что позволяет реализовать главную функцию этих МТ, стресс-респонсивную, а β -домен более задействован в депонировании металлов, что эффективно реализуется у МТ моллюсков. МТ лягушки, которые функционируют в условиях высокого уровня меди в ткани, наименее эффективно участвуют в депонировании металлов и антиоксидантной защите, поскольку легко окисляются. Прогноз реактивности МТ может быть осуществлен на основании изучения свойств их доменов и соотношения концентрации МТ-SH/МТ-Me.

Работа выполнена при поддержке МОН Украины (М/65-2006, М/256-2008, М/567-2009, М/13-2009), ГФФИ Украины (№Ф29/321-2009, №Ф32/202-2011), МОНМС Украины (№118Б, №М/25-2011), НАН Украины (№34-10, 34-11).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Farkas A. et al. Vulnerability of biomarkers in the indigenous mollusk *Anodonta cygnea* to spontaneous pollution in a transition country // *Chemosphere*. 2010a. Vol. 81, N 10. P. 1342–1351.
2. Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Priydnun C.V. et al. Variability of responses in the crucian carp *Carassius carassius* from two Ukrainian ponds determined by multi-marker approach // *Ecotox. Environ. Saf.* 2010b. Vol. 73, N 8. P. 1896-1906.
3. Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Stoliar O.B. Population-related molecular responses on the effect of pesticides in *Carassius auratus gibelio* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2012. Vol. 155C, N 2. P. 396-406.
4. Falfushynska H.I., Gnatyshyna L.L., Stoliar O.B., Nam Y.K. Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus gibelio* from two populations // *Comp. Biochem. Physiol.* 2011. Vol. 154, N 3. P. 242–253.
5. Falfushynska H.I., Romanchuk L.D., Stoliar O.B. Reactivity of metallothioneins in frog *Rana ridibunda* treated by copper and zinc ions // *Укр. біохім. журн.* 2010с. Т. 82, N 3. С. 17–26.
6. Falfushynska H.I., Romanchuk L.D., Stolyar O.B. Seasonal and spatial comparison of metallothioneins in frog *Rana ridibunda* from feral populations // *Ecotoxicology*. 2008. Vol. 17, № 8. P. 781–788.
7. Lee S.Y., Stoliar O., Nam Y.K. Transcriptional Alteration of Two Metallothionein Isoforms in Mud Loach *Misgurnus mizolepis* Fry during Acute Heavy Metal Exposure // *Fisheries Aquat. Sci.* 2010. Vol. 13, N 2. P. 112-117.
8. Stoliar O.B., Falfushynska H.I. Metallothionein of aquatic animals as a biomarker. Coverage of vulnerability // *Global J. Environmental Science & Technology*. Simplex Academic Publishers. 2011. In press
9. Valls M., Bofill R., Gonzales-Duarte R. et al A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, N 35. P. 32835-32843.
10. Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms // *Comp. Biochem. Physiol.* 2007. Vol.146C. P. 281-300.

PHYLOGENETIC PECULIARITIES OF METALLOTHIONEINS FUNCTION IN THE FRESHWATER ANIMALS AND THEIR DETERMINATION

L.L. Gnatyshyna, H.I. Falfushynska, A.Ye. Mudra, O.O. Turta, O.I. Goryn,
Ya.V. Bazhura, O.B. Stoliar

Metal-binding properties and antioxidant potential of metallothioneins (MTs) in freshwater animals, fish, amphibian and bivalve mollusk, subjected to environmental or modern stress are compared based on the analysis of their domain structure and reactivity. The distorting of metal-buffering and antioxidant functions of MTs seems to be one of the peculiarities of the total injury provoked in fish, mollusks and particularly in amphibians by environmental pollution.

ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИЯ ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

В.К. Голованов

*ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Борок, Россия, E-mail: vkgolovan@mail.ru*

Поведенческая терморегуляция гидробионтов в последние 30-40 лет стала составной частью ряда исключительно важных областей исследования. Среди них – температурные адаптации водных животных, эколого-физиологический и эволюционный оптимум рыб и беспозвоночных, верхние и нижние температурные границы жизнедеятельности гидробионтов. В первую очередь, это вызвано общемировой тенденцией потепления климата, а также увеличением объема сбросных подогретых вод с атомных и тепловых электростанций, а также с крупных промышленных объектов. Аномально высокие значения температуры пресных и морских вод стали реальностью и создали некомфортные условия обитания многим холодолюбивым и теплолюбивым видам рыб. Возникшая временная и пространственная температурная аномалия, по сути, задала условия, в которых выживание и нормальное существование тех или иных видов напрямую зависит от сочетания измененных условий среды с температурными требованиями рыб.

При оценке эффективности существования той или иной популяции рыб, очень важно знать зону температурного эколого-физиологического оптимума и пессимума (т.е. границ жизнедеятельности, в особенности верхних). Это необходимо и в теоретическом плане, и в практике рыбного хозяйства. Методы определения оптимальных условий питания, роста, воспроизводства и, в конечном счете, продуктивности разнообразны и далеко не всегда данные, полученные разными методами, совпадают. В последние годы широкое распространение получил метод «конечного термопреферендума», при котором рыбам предоставляется возможность самим выбрать зону эколого-физиологического оптимума. Эта область (окончательно избираемые температуры – ОИТ) хорошо совпадает с зоной оптимального роста многих видов рыб, а также высоко коррелирует со значениями их верхних летальных температур или ВЛТ (Jobling, 1981; Brett, 1971; Голованов, 2012).

Известно, что температура акклимации животных, сезон года, время суток, фотопериод, особенности обмена веществ, возраст рыб, их пол и стадия зрелости, эколого-биохимический и иммунологический статус, голодание, инфекции, токсические вещества и соли тяжелых металлов – далеко не полный перечень факторов, оказывающих влияние на выбор температуры у рыб в искусственных и естественных термоградиентных условиях. Выявление эколого-физиологических и биохимических основ поведенческой терморегуляции водных животных необходимо для более полной и глубокой оценки зависимости избираемых и окончательно избираемых температур от факторов среды и экологических особенностей разных видов рыб.

Поведенческая терморегуляция рыб представляет собой специфическую адаптацию к температурному фактору среды, а также особую форму поведения, в основе которого лежит самопроизвольный выбор оптимальных значений температуры в градиентных условиях. В природных и экспериментальных условиях рыбы самопроизвольно выбирают определенную температурную зону, проявляя реакцию термоизбирания или термопреферендума (Fry, 1947; Ивлев, Лейзерович, 1960). В опытных условиях отдельные особи или группы рыб, как правило, не остаются в той температуре, к которой они были первоначально акклимированы. Выбор определенной температуры зависит от температуры предварительной акклимации, сезона года, возраста животных и стадии их половой зрелости, времени суток и ряда других факторов. Скорость и направление перемещений в градиенте температуры у разных видов рыб существенно отличаются. По исходному определению Ф. Фрая (Fry, 1947), температура, в которой данная группа рыб сосредотачивается после предоставления возможности свободного выбора, определяется как избираемая (по В.С. Ивлеву) температур. Короткая (минуты-часы) продолжительность опытов позволяет фиксировать сам факт реакции термоизбирания, ее первый начальный этап. Однако только при длительной регистрации (порядка 2-12 суток) в эксперименте и, что более сложно, в естественных водоемах удается определить окончательно избираемую температуру, в которой все особи, в конце концов, сосредотачиваются, независимо от их термального прошлого (Fry, 1947).

Процесс выбора ОИТ, протекающий в течение 2-15 суток, по всей видимости, сопровождается процессом акклимации. Это позволяет водным животным своевременно компенсировать те физиолого-биохимические изменения, которые возникают при изменении температуры окружающей среды в процессе постоянного выбора и достижения оптимальной термозоны. Вместе с тем, между акклимацией и терморегуляционным поведением существует принципиальная разница. Если в первом случае организм рыб следует за изменением условий среды пассивно, то во втором – происходит спонтанный, самопроизвольный поиск и выбор оптимальной в соответствующий сезон года температуры в зависимости от периода онтогенеза и стадии половой зрелости рыб (Голованов, 2012).

Эколого-физиологический, этологический и биохимический механизмы выбора температуры в градиенте действия фактора весьма сложны и малоизучены. Как было показано С. Салливан (Sullivan, 1954), проявление терморегуляционного поведения у рыб возможно только при нормальном функционировании анализаторов и нервного аппарата в целом (терморцепторы, головной мозг, двигательные мышцы). Гетерогенная акклимация карпа *Cyprinus carpio* (L.) и американской палии *Salvelinus fontinalis* (Mitch.) в экспериментах, опыты по нагреву и охлаждению переднего мозга рыб с помощью термодов, а также другие данные позволили Л. Кроушоу (Crawshaw, 1977) построить гипотетическую схему, демонстрирующую роль центральной нервной системы (ЦНС) в процессе температурного избирания у различных видов рыб. Предполагается, что именно в отделах переднего мозга холоднокровных животных происходит анализ постоянно получаемой термальной информации, ее оценка и сравнение с так называемыми «эталонными температурами» или «set-point», по физиологическим представлениям (Kluger, 1979). Эти эталоны могут различаться в зависимости от времени года и суток, возраста животных и их физиологического статуса. В результате происходит активация поведенческих, дыхательных и других реакций, а также, вероятно, включение акклимационных (компенсаторных) механизмов. В силу сравнительно малой изученности терморцепторных систем и этологических особенностей термопреферендума морских и пресноводных рыб как отдельные элементы эколого-физиологического, этологического и биохимического механизмов температурного выбора, так и вся схема в целом требуют дополнительных исследований и уточнений. Несмотря на классические исследования в области биохимии (Hochachka, Somero, 2002), работы, характеризующие физиологические и биохимические особенности организма рыб в процессе выбора температур в термоградиентных условиях, практически отсутствуют.

Наиболее интересными и важными представляются следующие вопросы. Что обеспечивает разницу реакций организма рыб при самопроизвольном выборе температуры в термоградиентных условиях и в случае принудительной акклимации? Чем вызвана и обеспечивается существенная разница в скорости выбора зон оптимальной температуры в градиенте? Существуют ли внутривидовые физиолого-биохимические различия и способы, обеспечивающие расширение адаптивных возможностей гидробионтов? Какие эколого-физиологические и биохимические реакции задействованы в поведенческой терморегуляции рыб в лабораторных условиях и в природе? Как меняется физиолого-биохимический статус организма у больных рыб, в аномально высокой и низкой температуре, при вхождении рыб в состояние зимней и летней спячки? В докладе будут рассмотрены аспекты, характеризующие физиолого-биохимическую компоненту данных процессов и явлений.

Поведенческая реакция животных – наиболее быстрый и энергетически выгодный способ избежать неблагоприятных условий среды, в то время как биохимическая адаптация часто является крайним средством, к которому организм прибегает в случае невозможности использовать поведенческие или физиологические механизмы (Hochachka, Somero, 2002). Как свидетельствует ряд последних публикаций в России и за рубежом, исследование эколого-физиологических, этологических, биохимических и иммунологических механизмов поведенческой терморегуляции рыб и беспозвоночных продолжается. Сложность оценки механизмов поведенческой терморегуляции заключается в необходимости скоординированной работы специалистов разного профиля. Поскольку рыбы отличаются широким спектром адаптивных приспособлений и большим видовым разнообразием, использование их в качестве модельного объекта предоставляет уникальную возможность не только решить некоторые

вопросы в области поведенческой терморегуляции рыб, но и выявить ряд других важных биологических закономерностей.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» и Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-719.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голованов В.К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Москва: ИПЭЭ РАН, 2012. 47 с.
2. Ивлев В.С., Лейзерович Х.А. Экологический анализ распределения животных в градиентных температурных условиях // Тр. Мурманск. морск. биол. ин-та. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1960. Вып.1(5). С. 3–27.
3. Brett J.R. Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // Am. Zool. 1971b. V. 1. № 11. P. 99–113.
4. Crawshaw L.J. Physiological and behavioral reactions of fishes to temperature change // Temperature preference studies in environmental impact assessments: an overview with procedural recommendations. Proceed. Symp. and Panel Discuss.. Northeast Fish and Wildlife Conf. (Northeast Division, Amer. Fish. Soc.). Hershey. Pa. April 27. 1976 / J. Fish. Res. Board Can. 1977. V. 34. № 5. P. 730–734. [Ed. Richards F.P., Reynolds W.W., McCauley R.W.]
5. Fry F.E.J. Effects of the environment on animal activity // Univ. Toronto Stud., Biol. Ser., 1947. No 55. Publ. Ontario Fish. Res. Lab., No 68. 62 p.
6. Golovanov V.K. The ecological and evolutionary aspects of thermoregulation behavior of fish // J. Ichthyology. 2006. V. 46. Suppl. 2. P. S180–S187.
7. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution // Oxford-New York: Oxford University Press, 2002. 466 p.
8. Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. V. 19. № 4. P. 439–455.
9. Kluger M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978 / Amer. Zool. 1979. V.19. № 1. P. 295–304.
10. Sullivan C.M. Temperature reception and responses in fish // J. Fish. Res. Board Can. 1954. V. 11. № 2. P. 153–170.

BEHAVIOR THERMOREGULATION OF FRESHWATER FISHES. ECOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MECHANISMS.

V.K. Golovanov

Possible ecological, physiological, ethological and biochemical mechanisms for behavior thermoregulation of fish different ecological groups are briefly analysed. The importance of study of such mechanisms in conditions of a climate warming and increase for levels of thermal loading on fresh and sea waterbodies is proved.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

И.Л. Голованова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

E-mail: vkgolovan@mail.ru

Согласно современной концепции питания начальные этапы ассимиляции пищи у рыб осуществляются с помощью трех основных (полостное, мембранное и внутриклеточное) и двух дополнительных (симбионтное и аутолитическое) типов пищеварения (Уголев, Кузьмина, 1993). Общие закономерности полостного и мембранного пищеварения у рыб в настоящее

время детально исследованы. В современных экологических условиях особую актуальность приобретает изучение влияния на эти процессы изменяющихся природных и антропогенных факторов. В докладе будут представлены результаты изучения действия *in vivo* ряда физических факторов (температура, рН, электромагнитное поле) и химических агентов (соли тяжелых металлов и органические соединения) на скорость гидролиза углеводов в пищеварительном тракте пресноводных костистых рыб. Несмотря на относительно низкое содержание углеводов в естественной пище большинства видов рыб, они играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма.

Поскольку переваривание углеводов у рыб, как и у других животных, происходит главным образом в кишечнике, оценивали активность гликозидаз именно в этом отделе пищеварительного тракта. В гомогенатах слизистой оболочки кишечника определяли активность: α -амилазы КФ 3.2.1.1, сахаразы КФ 3.2.1.48, мальтазы КФ 3.2.1.20 и амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы) (Уголев и др., 1969). Кинетические характеристики гидролиза углеводов (K_m и V) определяли графическим методом Лайнуивера-Берк.

Температура – важнейший абиотический фактор, определяющий условия питания и скорость биохимических процессов у эктотермных животных. Для рыб, обитающих в умеренных широтах России, температурный диапазон жизнедеятельности находится в пределах от 0° до 38°С. Установлено, что ферментные системы пищеварительного тракта рыб хорошо адаптированы к температурным условиям среды обитания (Уголев, Кузьмина, 1993). В настоящее время в результате сброса подогретых вод промышленных предприятий, атомных и тепловых электростанций нарушается температурный режим водоемов. Для выяснения последствий этого явления на переваривание углеводов у рыб проводили эксперименты с различной скоростью нагрева воды. В лабораторных условиях рыб предварительно акклиматизировали к температуре сезона (0, 10 или 20°С). Затем температуру воды повышали до критического уровня, при котором отмечалось нарушение локомоторной функции рыб. Значения критической температуры в различные сезоны у карповых видов рыб не превышали 40°С. При медленном повышении температуры воды со скоростью около 1°С/сут активность гликозидаз во все сезоны достоверно увеличивалась. Более высокие скорости нагрева (4–50°С/ч), как правило, снижали скорость гидролиза углеводов в 2–7.5 раз во все сезоны, исключая лето. В этот сезон отмечено последовательное увеличение амилолитической активности с повышением скорости нагрева воды. Наиболее чувствительна к изменению скорости нагрева воды панкреатическая α -амилаза. Установлено, что скорость нагрева воды влияет на температурную функцию ферментов. При повышении температуры со скоростью 50°С/ч у карася отмечено смещение оптимума гидролиза крахмала с 60°С до 30°С, и уменьшение величины температурного коэффициента Q_{10} в интервале температур 30–40°С от 2.3 у контрольных рыб до 1.7 у опытных. Поскольку время температурного воздействия не превышало 5 часов, снижение скорости гидролиза углеводов при резком повышении температуры воды осенью и ранней зимой, по всей вероятности, обусловлено изменением физико-химических свойств ферментов или их мембранного окружения.

В последние десятилетия в северо-западной части России, увеличивается количество озер с низким значением рН воды. При этом окунь часто является единственным видом, обитающим в озерах с рН воды < 4.5. Несмотря на то, что в таких озерах преобладают окуни бентофаги (с более высоким содержанием углеводов в пище), активность сахаразы и амилолитическая активность у них может быть в 1.5–2.0 раза ниже, чем у окуней хищников из озер с нейтральным значением рН воды. Вместе с тем в опытах *in vitro* у окуня из кислотных озер показана большая устойчивость гликозидаз к снижению рН инкубационной среды, что может отражать адаптацию пищеварительной системы к длительному пребыванию в условиях ацидификации.

Магнитное поле (МП) является важным экологическим фактором, в присутствии которого протекала эволюция органического мира. Однако в связи с появлением антропогенных источников электромагнитных полей, на естественный магнитный фон накладываются поля искусственного происхождения. В последнее время накоплено много данных о действии МП на темпы раннего развития, морфологические и биохимические

показатели у рыб (Skauli et al., 2000; Крылов и др., 2010). Поскольку у большинства видов рыб все стадии эмбриогенеза протекают во внешней среде и прямое действие различных факторов возможно уже на самых ранних этапах индивидуального развития, особое значение имеет оценка отдаленных последствий действия агентов в зародышевый период. В экспериментах установлено, что кратковременное действие МП с частотой 72.5 Гц и величиной индукции 150 μ T на оплодотворенную икру оказывает пролонгированный эффект на пищеварительную функцию развивающейся молоди плотвы. Амилолитическая активность повышалась на 15%, активность сахаразы снижалась на 18% по сравнению с контролем, кинетические характеристики гидролиза углеводов при этом не изменялись. В то же время, действие МП с частотой 500 Гц повышало активность сахаразы на 55%, а значения K_m гидролиза сахаразы достоверно возрастали, свидетельствуя о снижении фермент-субстратного сродства у молоди рыб при действии низкочастотного МП в период эмбриогенеза.

Загрязнение водоемов соединениями тяжелых металлов – один из самых распространенных видов антропогенного воздействия. Многие из них обладают биологической активностью и накапливаются в тканях гидробионтов в концентрациях, в сотни раз превышающих их содержание в воде. В организм рыб тяжелые металлы попадают вместе с водой и пищей, при этом основной токсический эффект связывают с действием свободных ионов металлов.

Кадмий не является необходимым для организма животных металлом. В хронических экспериментах на тилапии установлено, что сублетальные концентрации ионов Cd (5 мг/л) необратимо снижают на 65% от контроля активность гликозидаз, гидролизующих крахмал, в то время как эффект *in vitro* составляет лишь 17%. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение скорости гидролиза углеводов в кишечнике тилапии лишь частично обусловлено прямым действием ионов Cd на ферменты. По всей вероятности, основной причиной снижения активности гликозидаз, наряду с уменьшением скорости синтеза ферментов, может быть снижение потребления пищи, что хорошо согласуется с представлениями о стимулирующем действии пищевых субстратов (Уголев, Кузьмина, 1993) на активность пищеварительных ферментов.

Медь – важнейший микроэлемент, в малых количествах необходимый для нормального функционирования организма, в то же время в высоких дозах токсичен. Кратковременное действие сублетальных концентраций ионов меди (0.01 мг/л) в эмбриональный период снижает амилолитическую активность у развивающихся сеголетков плотвы на 25%, активность сахаразы – на 60% от контроля, в то время как в условиях *in vitro* эффект отсутствует. Установлено, что в присутствии ионов меди *in vitro* (0.1–25 мг/л) активности пищеварительных гликозидаз у молоди ряда видов пресноводных рыб снижается (Голованова, 2010). Поскольку медь способна накапливаться в икре и различных органах рыб (Mazon, Fernandes, 1999) вполне вероятно, что ее избыток является одной из причин отдаленного эффекта при действии металла в эмбриональный период. Кроме того, при совместном действии МП (72.5 Гц, 150 μ T) и ионов меди (0.001 и 0.01 мг/л) отмечено увеличение сродства ферментов к субстрату, свидетельствующее об адаптивных изменениях этого показателя при кратковременном действии изученных факторов в период эмбриогенеза.

Ртуть занимает одно из ведущих мест среди тяжелых металлов, оказывающих токсическое действие на гидробионтов. Содержание ртути в мышцах рыб из незагрязненных участков Рыбинского водохранилища не превышает предельно допустимого содержания в пищевой рыбе 0.5 мг/кг, в других водоемах России достигает 3.1 мг/кг веса (Haines et al, 1992). Наиболее токсичны органические соединения ртути, в частности ее метилированная форма, обладающая липофильными свойствами и легко преодолевающая биологические мембраны. В экспериментах на молоди рыб, длительное время получавших естественный корм с повышенным содержанием ртути (0.3–0.5 мг/кг), показано снижение активности гликозидаз на 12–36%, причем активность панкреатической α -амилазы снижается в большей степени, чем амилолитическая активность или активность сахаразы. У окуня из природных водоемов с нейтральным значением pH воды показано увеличение значений K_m гидролиза дисахаридов, свидетельствующее о снижении сродства ферментов к субстрату с увеличением накопления ртути в организме. В то же время, у рыб, живущих в условиях acidification, выявлено адаптивное увеличение сродства ферментов к субстрату. Это может быть обусловлено более

высоким накоплением ртути в кишечнике окуня из кислотных озер и, по всей вероятности, позволяет частично компенсировать неблагоприятное влияние закисления среды на скорость гидролиза углеводов.

В результате хозяйственной деятельности человека в водоемы попадают вещества, чужеродные организму или природной среде, так называемые ксенобиотики. При изучении отдаленных последствий кратковременного действия хлорофоса в эмбриональный период осемененную икру инкубировали в растворах хлорофоса концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ мг/л до стадии подвижного эмбриона. Затем растворы заменили чистой речной водой. После перехода на внешнее питание личинки развивались в однотипных выростных прудах с естественной кормовой базой. Установлено, что у 4-х месячной молоди плотвы зависимость активности гликозидаз от концентрации хлорофоса была U – образной, указывая на стимулирующий эффект крайних доз токсиканта. Амилолитическая активность снижалась на 45–49% от контроля в средней точке дозозависимого профиля. Активность сахаразы, напротив, достоверно возрастала, а наибольший стимулирующий эффект (на 90–103%) отмечен в крайних точках испытанного диапазона концентраций. Разнонаправленные изменения амилолитической активности и активности сахаразы могут быть обусловлены различным влиянием хлорофоса на процессы синтеза панкреатических и собственно кишечных ферментов.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) – одна из самых распространенных групп стойких органических загрязнителей. Даже в малых дозах они оказывают токсическое и мутагенное действие, нарушают репродуктивную функцию, являются активными промоторами опухолевых новообразований и предшествующих им нарушений метаболизма (Niimi, 1996). В хроническом эксперименте установлено негативное действие ПХБ поступающих с загрязненной пищей (50.8 нг/г сырой массы) и грунтом (425.6 нг/г сухой массы), на активность ферментов, расщепляющих белковые и углеводные компоненты корма у молоди плотвы. Экспозиция сеголетков в течение 218 сут в большей степени снижала протеолитическую (на 10–26%), чем амилолитическую активность (на 11%) слизистой оболочки; активность сахаразы изменялась разнонаправлено. Эти результаты отражают большую чувствительность протеиназ к хроническому действию ПХБ по сравнению с гликозидазами.

Интересно отметить, что в экспериментах с хлорофосом, ртутью, медью, ПХБ и МП снижение скорости начальных этапов ассимиляции углеводов не оказывало негативного влияния на линейно-массовый рост рыб. Подобное увеличение скорости роста отмечалось ранее в экспериментах с низкими концентрациями фенола, ртути, кадмия и меди в раннем онтогенезе других видов рыб (Глубоков, 1990). Вполне вероятно, что увеличение роста может быть обусловлено компенсаторным увеличением эффективности усвоения низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот, которыми богата естественная пища молоди большинства видов рыб.

При исследовании двух популяций леща из участков Рыбинского водохранилища с различной антропогенной нагрузкой показано значительное сходство уровня активности и температурного оптимума гликозидаз у рыб загрязненного Шекснинского и относительно чистого Моложского плесов. Более низкая активность мальтазы в зоне температуры 0–20°C и более высокие значения $E_{акт}$ гликозидаз у леща Шекснинского плеса свидетельствуют о снижении эффективности гидролиза углеводных компонентов корма, а увеличение фермент-субстратного средства – об адаптивных изменениях этого показателя с ростом уровня антропогенной нагрузки. Вполне вероятно, что это обусловлено комплексным действием токсикантов, в том числе ПХБ и тяжелых металлов, содержание которых в донных отложениях и тканях рыб Шекснинского плеса значительно выше по сравнению с Моложским плесом (Чуйко и др., 2010).

Таким образом, в экспериментах *in vivo* и натуральных наблюдениях показано, что различные по природе антропогенные факторы (повышенный уровень тепловой нагрузки, ацидификация водоема, МП, тяжелые металлы и органические загрязнители) могут изменять скорость гидролиза углеводов в кишечнике рыб. Совместное действие может усиливать или нивелировать эффекты раздельного влияния изученных агентов. Даже кратковременное действие малых концентраций органических ксенобиотиков, ионов меди или низкочастотного МП в период эмбриогенеза изменяют активность гликозидаз и кинетические характеристики

гидролиза углеводов у развивающегося потомства. Панкреатические ферменты более чувствительны к действию антропогенных факторов по сравнению с мембранными ферментами. Адаптации к действию указанных агентов осуществляются как за счет изменения уровня ферментативной активности, так и за счет изменения температурных и кинетических характеристик ферментов. Полученные данные расширяют представления о механизмах адаптации процессов пищеварения к действию различных по природе факторов внешней среды и позволяют прогнозировать последствия воздействия чужеродных веществ на гидролитическую функцию пищеварительной системы рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голованова И.Л. Влияние биогенных металлов (Cu, Zn) на активность карбогидраз молоди рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 98–103.
2. Глубоков А.П. Рост трех видов рыб в ранние периоды онтогенеза в норме и в условиях токсического воздействия // Вопр. ихтиологии. 1990. Т. 39. Вып. 1. С. 137–143.
3. Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г., Осипова Е.А. Влияние магнитного поля и ионов Cu^{2+} на раннее развитие плотвы *Rutilus rutilus* (L.) (Cyprinidae, Cypriniformes) // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2010. Т. 3. № 2. С. 199–210.
4. Уголев А.М., Иезуитова Н. Н., Масевич Ц. Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука, 1969. 216 с.
5. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
6. Чуйко Г.М., Законнов В.В., Морозов А.А. и др. Пространственное распределение и качественный состав полихлорированных бифенилов (ПХБ) и хлорорганических пестицидов (ХОП) в донных отложениях и леще (*Abramis brama* L.) из Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2010. № 2. С.98–108.
7. Haines T.A., Komov V.T., Jagoe Ch.H. Lake acidity and mercury content of fish in Darwin National Reserve, Russia // Environ. Pollut. 1992. V. 78. № P. 107–112.
8. Mazon A.F., Fernandes M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1999. V. 63. № 6. P. 797–804.
9. Niimi A. J. PCBs in aquatic organisms // In: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood F.W. (eds) Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations. Boca Raton-NY-London-Tokyo: CRC Press. 1996. Ch.5. P.117–151.
10. Skauli K.S., Reitan J.B., Walther B.T. Hatching in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to a 50 Hz magnetic field // Bioelectromagnetics. 2000. V. 21. № 5. P. 407–410.

PHYSIOLOGO-BIOCHEMICAL MECHANISMS OF ADAPTATIONS OF FISH DIGESTIVE SYSTEM TO ANTHROPOGENOUS FACTORS.

I.L. Golovanova

The activity, temperature and kinetic characteristics of glycosidases of intestinal mucosa and chyme in fish under various anthropogenic factors are investigated. The raised level of thermal loading, reservoir acidification, low-frequency magnetic field, heavy metals and organic pollutants can change the velocity of carbohydrates hydrolysis in fish intestines. Adaptations to action of the anthropogenic agents are carried out both at the expense of changes of digestive glycosidase activity, and at the expense of change of temperature and kinetic characteristics of enzymes. The decrease in K_m values of carbohydrate hydrolysis evidencing the increase in the enzyme to substrate affinity may be the attribute of the adaptive reactions of fish in response to effect of anthropogenic factors.

ВЛИЯНИЕ ПОЛА, СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД, КРАТКОСРОЧНОГО ГОЛОДАНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ *PSETTA MAXIMA MAEOTICA*

И.В. Головина, О.Л. Гостюхина, А.Н. Ханайченко, В.Е. Гирагосов
Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,
Севастополь, Украина
ivgolovina@mail.ru

Исследование физиолого-биохимических особенностей рыб является актуальным направлением экологической физиологии (Shulman, Love, 1999, Эмеретли, Русинова, 2001, Руднева, 2003). Камбала калкан – ценный промысловый вид, обитающий в шельфовой зоне Черного моря. Продолжительность жизни, размер стад, уменьшение размеров облавливаемых особей, преобладание самцов над самками, аномальная пигментация и другие биологические показатели калкана в прибрежных водах Севастополя, наиболее подверженных антропогенному загрязнению, свидетельствуют о стрессовом состоянии популяции этого вида рыб (Гирагосов и др., 2007, Ханайченко, Ковтун, 2009). Попытки искусственного разведения камбалы калкан пока не дали однозначных результатов, а содержание рыб в технологических системах, применяемых в рыбоводстве, часто сопряжено с развитием состояния стресса. Устойчивость животных к различным стресс-факторам во многом определяется антиоксидантной системой и соотношением ее активности с уровнем пероксидного окисления липидов.

Целью настоящей работы было установить изменения величины показателей антиоксидантной (АО) системы и пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в период нереста, связанные с полом и стадией зрелости гонад рыб, а также влиянием кратковременного выдерживания в аквариуме без кормления.

Объектом исследования служили половозрелые особи черноморской камбалы калкан *Psetta (Scophthalmus) maxima maeotica* (L, 1785) на V и VI стадии зрелости гонад, выловленные в апреле-мае в районе Севастополя.

Препарирование, гомогенизацию и центрифугирование тканей камбалы (печени, гонад, жабр, красных и белых мышц) проводили общепринятыми методами при температуре 0–4°C. Активность ферментов измеряли при стандартной температуре 25°C на СФ-26. В супернатанте определяли активность каталазы (1.11.1.6) по реакции с молибдатом аммония, глутатионпероксидазы (ГП, 1.11.1.9) – по накоплению окисленного глутатиона (GSSG), глутатионредуктазы (ГР, 1.6.4.2) – по убыли НАДФН; в гомогенате определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH) по реакции с аллоксановым реактивом и ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) – по образованию триметинового комплекса, как описано ранее (Солдатов и др., 2008). Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по количеству ТБК-АП. Активность ферментов выражали в мкмоль субстрата или продукта в 1 минуту на 1 мг белка, уровень GSH – в мкг на 1 г ткани, а ТБК-АП – в мкмоль МДА на 1 г белка. Содержание белка определяли методом Лоури. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента, результаты представлены как средняя ± ошибка средней, объем выборочных совокупностей составлял 6–10 особей.

Показатели АО активности и уровня ПОЛ имеют тканевую специфику, связанную с функциональными особенностями тканей. Наиболее сбалансированное соотношение активности АО комплекса и процессов ПОЛ выявлено в жабрах камбалы. Об этом свидетельствует минимальный уровень ТБК-активных продуктов и повышенная активность ферментов антиоксидантной защиты высокого (глутатионовый комплекс) и низкого сродства к субстрату (каталаза). Печень и красные мышцы как более метаболически активные ткани характеризуются высоким уровнем ПОЛ, ведущая роль в их защите от окислительной деструкции принадлежит каталазе. Белые мышцы и гонады обладают минимальной антиоксидантной активностью на фоне сравнительно высокого содержания ТБК-активных продуктов.

Установлены половые особенности АО системы и ПОЛ тканей черноморской камбалы калкан в нерестовый период (табл.). Самки камбалы по сравнению с самцами имеют более высокий уровень ПОЛ в белых мышцах и жабрах, глутатиона – в белых мышцах, жабрах и гонадах, а также активности каталазы в печени. Глутатионпероксидная система самок отличается также повышенной активностью ГП в печени, красных и белых мышцах и ГР – в

красных мышцах. Самцы камбалы превосходили самок только по активности ГР в гонадах и активности каталазы в красных и белых мышцах.

Печень и красные мышцы рыб принимают участие в обеспечении пластических и энергетических нужд формирующихся гонад и половых продуктов (Shulman, Love, 1999). Такие процессы интенсивнее протекают у самок. В печени самок калкана выше, чем у самцов, содержание гликогена, белка, общих липидов, ДНК и РНК, из мышц в яичники активно транспортируются липидные компоненты (Басова, 2002). Высокая активность АО ферментов у самок камбалы, вероятно, является ответной реакцией на усиление свободно-радикального окисления.

У самцов эти процессы в красных и белых мышцах и жабрах, по-видимому, связаны с повышенной плавательной активностью во время нереста. Именно в нерестовый период особенно выражены различия в энергетическом обеспечении самцов и самок, обусловленные поведением рыб в период размножения: самцы активны и агрессивны, а самки спокойны.

Таблица Показатели антиоксидантной системы и пероксидного окисления липидов в тканях самок и самцов камбалы калкан в период нереста

| Ткани | Активность ГП, мкмоль GSSG мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка | Активность ГР, мкмоль НАДФН мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка | Содержание GSH, мкг г ⁻¹ ткани | Активность каталазы, мкмоль H ₂ O ₂ мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка | Содержание ТБК-АП, мкмоль МДА г ⁻¹ белка |
|-----------------|---|--|---|--|---|
| Печень ♀ | 23,71±5,23* | 2,36±1,13 | 446,7±90,9 | 21,64±3,23* | 98,89±18,46 |
| ♂ | 11,25±1,31* | 1,06±0,15 | 302,5±52,2 | 12,98±0,81* | 119,15±15,32 |
| Красные мышцы ♀ | 40,28±0,72* | 2,13±0,18* | 208,5±47,8 | 9,35±3,53* | 133,01±54,45 |
| ♂ | 28,72±5,21* | 1,10±0,12* | 307,1±82,8 | 19,20±3,12* | 89,30±15,86 |
| Белые мышцы ♀ | 21,07±1,09* | 0,44±0,06 | 224,6±30,1* | 4,77±1,19* | 171,40±47,72* |
| ♂ | 14,31±2,97* | 0,50±0,12 | 131,5±24,5* | 10,18±2,12* | 58,59±5,83* |
| Жабры ♀ | 33,43±4,15 | 2,56±0,60 | 233,2±38,9* | 28,33±6,27 | 98,65±32,0* |
| ♂ | 35,41±6,07 | 3,40±0,77 | 116,2±24,2* | 62,06±28,0 | 29,84±4,17* |
| Гонады ♀ | 10,21±2,09 | 0,49±0,06* | 301,7±49,0* | 6,56±1,88 | 86,22±12,50 |
| ♂ | 13,69±3,69 | 1,47±0,15* | 167,3±25,5* | 4,89±1,25 | 93,96±18,74 |

* – различия между самцами и самками достоверны, p≤0,05

Для белых мышц самцов баренцевоморской камбалы *Pleuronectes platessa* по сравнению с самками в это время характерно более высокое абсолютное и относительное содержание АТФ, суммарное содержание адениловых нуклеотидов (Овчинникова, Тимакова, 2008). Возможно, что высокая активность каталазы в жабрах, красных и белых мышцах черноморской камбалы предохраняет эти ткани от окислительного повреждения в период больших энергетических затрат.

Дифференциальное сравнение половозрелых самцов и самок V и VI стадии зрелости гонад, т.е. с нетекучими и текучими половыми продуктами, показало, что наиболее существенные изменения параметров АО активности и уровня ПОЛ происходят у самок калкана на стадии VI. В гонадах и печени снижался уровень ТБК-активных продуктов в 1,6 и 2,1 раза соответственно (p≤0,05). Активность ГП и ГР в гонадах уменьшалась в 1,6–1,8 раза (p≤0,05) – до 6,9 и 0,4 мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка соответственно, в то время как ресурс GSH, напротив, возрастал в 1,9 раза (p≤0,05). В жабрах этих самок увеличивалась активность ГП и уровень GSH, а в красных мышцах – активность каталазы. В белых мышцах активность ГР понижалась.

У самцов камбалы на стадии VI наблюдался рост активности ГП в жабрах в 1,5-раза ($p \leq 0,05$) и повышение содержания GSH в белых мышцах в 2,6 раза до $189,4 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани ($p \leq 0,05$). В АО комплексе гонад у самцов достоверных изменений при переходе от V к VI стадии зрелости не обнаружено. В отличие от самок снижение уровня ТБК-активных продуктов происходило во всех тканях самцов, максимальные изменения установлены в красных мышцах и гонадах, различия были достоверны для всех тканей ($p \leq 0,05$), кроме жабр.

Исследованные показатели являются чувствительными индикаторами процессов, происходящих в системе антиоксидантной защиты и пероксидного окисления липидов в тканях камбалы, и отражают эколого-физиологические особенности самцов и самок в репродуктивный период.

Распространенным физиологическим состоянием рыб на протяжении годового и жизненного цикла является голодание, его физиолого-биохимические особенности в естественных и экспериментальных условиях исследованы для ряда черноморских видов рыб (Shulman, Love, 1999, Эмеретли, Русинова, 2001).

В настоящей работе мы использовали параметры антиоксидантного комплекса также как биомаркеры прооксидантного состояния в тканях камбалы при кратковременном голодании. Группу половозрелых рыб после отлова не кормили и выдерживали в аквариумах объемом 4 м^3 с проточной морской водой (температура воды $16-18^\circ\text{C}$, соленость 18‰). По срокам акклимации в аквариуме камбал разделили на три группы, равномерно представленные особями обоего пола: контрольная, 3-4 суток и 8 суток содержания.

В печени голодавших камбал по сравнению с контрольными ($524,37 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани) выявлено значительное снижение уровня GSH, начиная с 3-4 дня ($269,70 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани, в 1,9 раза, $p \leq 0,001$), и вплоть до 8 дня голодания ($187,44 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани, в 2,8 раза, $p \leq 0,05$), и неизменный уровень ПОЛ и активности каталазы, ГР и ГП.

В жабрах наибольшее влияние голодание оказало на содержание ТБК-активных продуктов и GSH, содержание которых постепенно снижалось и на восьмой день уменьшилось соответственно в 3,9 (от 98,98 до $25,22 \text{ мкмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани, $p \leq 0,05$) и 2,35 раза (от 233,22 до $99,26 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ ткани, $p \leq 0,05$).

Однако в большинстве других случаев флуктуация параметров антиоксидантного комплекса и ПОЛ была незначительна и свидетельствовала, вероятно, о том, что величина их находится в пределах физиологической нормы и отражает компенсаторные изменения исследованных показателей при краткосрочном голодании. На начальных этапах адаптации к голоданию не произошло существенного сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, что характеризует высокую буферную емкость антиоксидантной системы в исследованных тканях камбалы.

Выявленные особенности организации АО комплекса и его соотношения с ПОЛ следует учитывать при использовании этих показателей в качестве индикатора физиологического состояния камбалы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shulman G.E., Love R.M. The Biochemical Ecology of Marine Fishes, Advances in Marine Biology. – San Diego: Acad. Press, 1999. 36. 351 p.
2. Эмеретли И.В., Русинова О.С. Активность ферментов основных путей окисления углеводов в тканях рыб // Гидробиол. журн. 2001. 37, № 1. С. 79–87.
3. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи соврем. биологии. 2003. 123, № 4. С. 391 – 400.
4. Гиригосов В.Е., Ханайченко А.Н., Ельников Д.Е. Характер и причины изменчивости основных показателей состояния нерестовой популяции черноморской камбалы-калкан на юго-западном шельфе Крыма // Современные проблемы Азово-Черноморского региона: Материалы III Междунар. конф. (Керчь, 10-11 окт., 2007 г.). Керчь: ЮгНИРО. 2007. С. 3-9.
5. Ханайченко А.Н., Ковтун О.А. Первые находки гипомеланизированной камбалы калкан в Черном море // Морской экологический журнал, 2009. 8, № 3. с. 84.
6. Солдатов А.А. Гостюхина О.Л., Головина И.В. Состояние антиоксидантного ферментативного комплекса тканей черноморского моллюска *Mytilus galloprovincialis* Lam. в условиях естественного окислительного стресса // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2008. 44, № 2. С. 150–155.

7. Басова М.М. Функциональные особенности химического состава печени, мышц и гонад самцов и самок черноморской камбалы: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Симферополь, 2002. 18 с.
8. Овчинникова С.И., Тимакова Л.И. Исследование сезонных, половых и видовых особенностей биоэнергетического состояния белых мышц трески и морской камбалы // Вестник МГТУ. 2008. Т. 11, №3. С.432–437.

THE EFFECT OF SEX, STAGE OF GONAD'S MATURITY, SHORT-TERM STARVATION ON THE CHARACTERISTICS OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF *PSETTA MAXIMA MAEOTICA*

I.V. Golovina, O.L. Gostyukhina, V.E. Giragosov, A.N. Khanaychenko

The activity of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), glutathione reductase (EC 1.6.4.2) and catalase (EC 1.11.1.6) and level of reduced glutathione and TBA-active products in liver, gonads, gills, red and white muscles of the mature Black Sea turbot have been determined in the spawning period. The dependence of the balance between antioxidant activity and lipid peroxidation from tissue's kind, sex of the fish, stages of gonad's maturity (the males and females of V and VI stages have been compared) and mobility have been shown. Short-term starvation (from 3 to 8 days) has led to fluctuation of parameters investigated in some tissues, however the buffer capacity of antioxidant system on the whole was high enough.

Key words: antioxidant complex, lipid peroxidation, flounder, *Psetta maeotica*, tissue peculiarities, spawning, males, females, stages of gonad's maturity, short-term starvation, Black Sea

ЖИЗНЕННЫЕ СТРАТЕГИИ МШАНОК В СООБЩЕСТВАХ ПЕРИФИТОНА

Гонтарь В.И.

*Зоологический институт РАН, Университетская наб, д.1, Санкт-Петербург, 199034, Россия,
e-mail: gontarvi@gmail.com*

Мшанки, как организмы - обрастатели, часто играют важную роль в сообществах перифитона и широко распространены континентальных водоемах. В пресноводных водоемах, как правило, это представители Phylactolaemata, хотя могут встречаться виды Gymnolaemata. Мшанки встречаются повсеместно в пресных водах, за исключением полярных регионов. Они могут жить в высокогорных озерах, в очень мелководных прудах и ручьях на равнинах и в глубинах больших озер. В пресных водоемах наиболее широк экологический спектр у наиболее примитивных филактолемат (фредерицеллид). Плюмателлиды и кристателлиды встречаются чаще в небольших хорошо прогреваемых водоемах. Гимнолематные мшанки встречаются в морских, эстуарных и солоноватоводных водоемах, а также иногда в пресноводных условиях. Большинство мшанок предпочитают проточные аэрированные водоемы. В различных условиях существования мшанки представляют важный компонент перифитона, нередко образуя мшанковые или мшанко-губковые сообщества. На расселение и развитие мшанок влияют характер субстрата, течения, температура, чистота воды, освещенность, состав пищевых ресурсов. Взаимовлияние этих факторов создает разнообразие жизненных форм зоариев мшанок. Колонии мшанок различны по форме, размеру и весу. Колонии характеризуются зоариальным полиформизмом часто в пределах одного и того же вида, что является реакцией на изменение экологических условий. На форму колонии влияют также возрастные изменения.

Мшанки представлены либо колониями, образующимися почкованием, либо покоящимися стадиями - статобластами или гибернакулами. Колониям Phylactolaemata свойственна сильная изменчивость зоариев, поэтому наряду с формой колонии для определения используют статобласты. Статобласты делятся на сессобласты и фрибласты. У *Paludicella* образуются, так называемые, инкапсулированные почки. У гимнолематных мшанок *Paludicella* и *Victorella* образуются также настоящие зимующие почки-гибернакулы. У Phylactolaemata формируются внутренние почки-статобласты. При половом размножении гимнолемат и филактолемат появляются свободноплавающие личинки, которые у Phylactolaemata не являются личинками в полном смысле этого слова, так как уже на ранних стадиях представляют собой малозоидные колонии (за исключением *Fredericella*). И статобластогенез, и гаметогенез протекают в канатике, и в начале лета происходит образование

гамет, а затем начинается образование статобластов. По-видимому, сохранение гаметогенеза в этом случае необходимо с точки зрения генетического обмена между колониями и популяциями. Личинки Phylactolaemata характеризуются ранним началом бесполого размножения. По существу, личинка Phylactolaemata есть свободноплавающая анцеструла, а в тех случаях, когда есть несколько полипидов—маленькая колония, которая потом у некоторых видов прикрепляется к субстрату, а, например, у *Cristatella* дает начало свободно движущейся колонии. Соответственно, акт прикрепления можно рассматривать как рекапитуляцию предковой формы колонии. О рекапитуляции также свидетельствует использование running strategy у многих прикрепленных колоний Phylactolaemata, а также ктеностомных *Paludicella* и *Victorella*, которая, вероятно, была первичной предковой формой зоария. *Plumatella fungosa*, как следует из названия, образует колонии похожие на губку. Однако она использует и running strategy, так как завоевывает пространство субстрата и как бы ползет по нему.

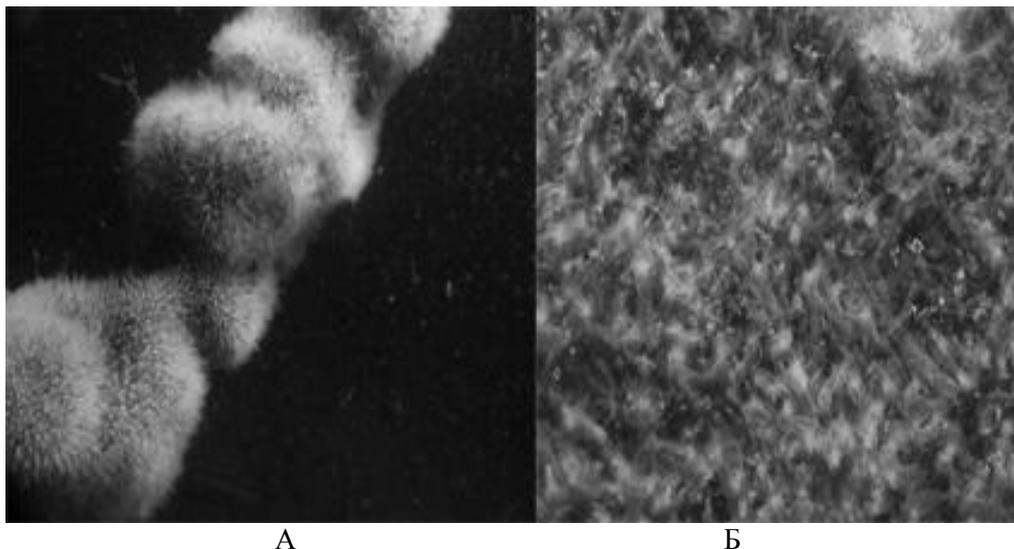


Рис. 1. Две формы колонии *Plumatella fungosa*—обычная (А) и использующая running strategy (Б). Фотографии колоний здесь и далее Michiel van der Waaij.

Фредерицеллиды селятся на любом субстрате. Форма их колонии отлична от некоторых других видов. Но и они также используют running strategy. Колонии *Hyalinella punctata* можно легко спутать в полевых условиях с *Plumatella repens* (Рис.2) также из-за использования ими похожей стратегии роста и формы колонии.

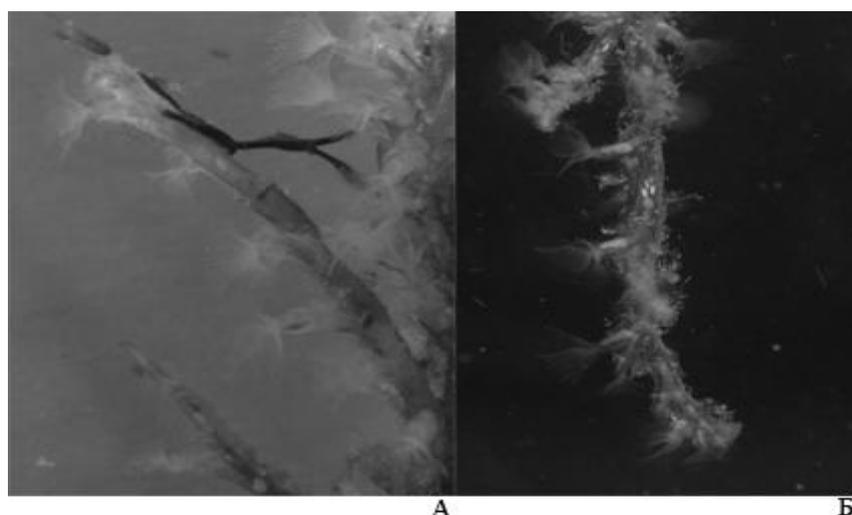


Рис. 2. А-*Hyalinella punctata*; Б-*Plumatella repens*

Ктеностомные мшанки иногда могут встречаться в континентальных водоемах (вероятнее всего, в солоноватоводных условиях), например, *Paludicella articulata* (Рис.3А, Б) и *Victorella pavidata* и могут использовать ползущую стратегию (Рис.3В, Г).

Встречаются и настоящие ползающие колонии, которые не прикреплены к субстрату. Это *Cristatella mucedo*(Рис.4А) и *Lophopus cristallinus* (Рис.4Б).

Phylactolaemata, в основном, не способны менять местоположение после прикрепления к субстрату, но *Cristatella* передвигается в течение всей своей жизни. Молодые колонии *Lophopus*, *Lophopodella*, и *Pectinatella* также могут двигаться. Движение в этих родах часто связано с разделением колонии на части с последующим отползанием друг от друга дочерних колоний.

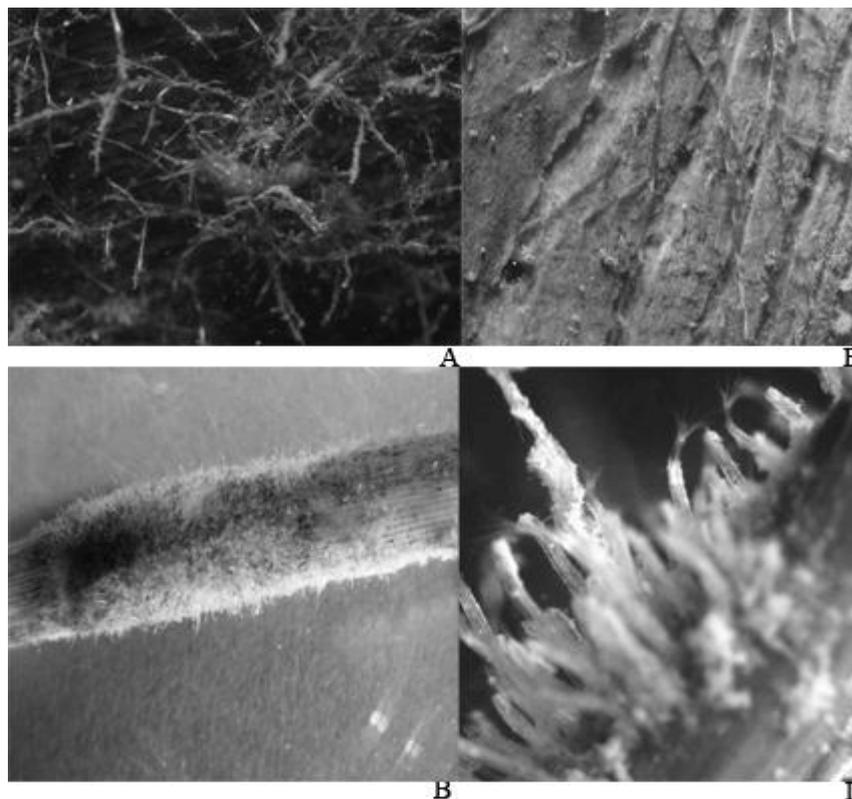


Рис.3. А и Б (running strategy)-у *Paludicella articulata*; В и Г-*Victorella pavidata*

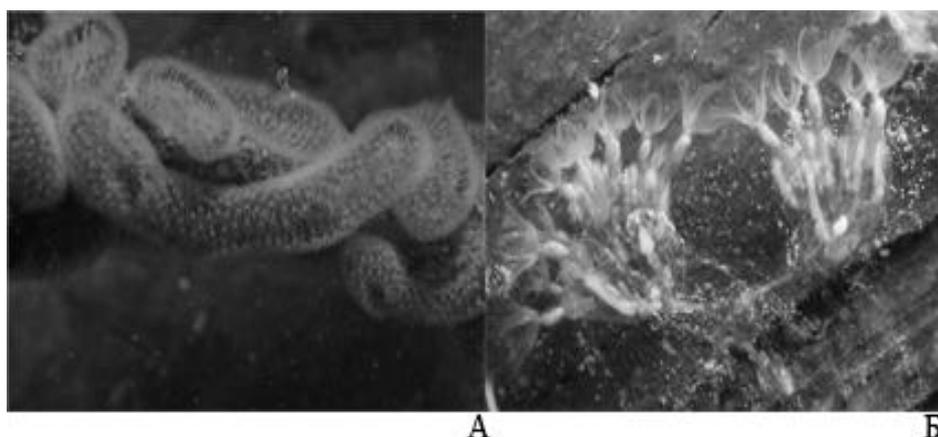


Рис.4. А-*Cristatella mucedo*; Б-*Lophopus cristallinus*

Большинство Phylactolaemata предпочитают более или менее затененные водные условия. *Fredericella sultana* встречалась в водопроводных трубах в полной темноте. Состав воды, по всей вероятности, важен для них, так как они предпочитают чистую воду. Phylactolaemata и их личинки, как правило, имеют положительный стереотаксис, хотя у некоторых видов есть

тенденция давать прямостоячие ветви. Plumatellidae, обладающие толстой кутикулой, могут противостоять на короткий период обсушиванию. Краепелин (1887) часто находил Phylactolaemata, растущих в мелких ручьях на плоских камнях и банках, которые неминуемо в той или иной степени обсыхали летом. Температура воды - главный фактор среды, контролирующий рост и выживание колоний Phylactolaemata. В умеренных широтах колонии погибают зимой из-за падения температуры, и выживают только за счет статобластов. Статобласты, образовавшиеся поздним летом, обычно остаются перезимовывать. Весной, когда температура достаточно повысится, новые колонии развиваются из статобластов, переживших зиму, и достигают наибольшего своего развития летом и ранней осенью, а затем умирают, когда температура снижается поздней осенью. Большинство видов умеренных широт имеют ежегодно два поколения колоний, возникающих из статобластов. Все статобласты должны оставаться в покое в определенном состоянии определенный период, различный у разных видов, прежде чем они начнут развиваться. Влияние температуры на время развития статобластов хорошо изучено. Содержание кислорода наиболее важно, поскольку статобласты, например, у *Pectinatella* не развиваются в воде с низким содержанием кислорода или при отсутствии кислорода, хотя сохраняют жизнеспособность. Свет не влияет на процент развивающихся статобластов. Летние статобласты, удаленные из живых колоний, не выдерживают более одной недели осушки. Процент развивающихся статобластов снижается после увеличения времени осушки, но их время развития практически не изменяется. Доступная информация указывает, что статобласты адаптированы для переживания неблагоприятных условий, но осушки и замораживания недостаточно, чтобы их способность выдерживать эти условия изменялась в пределах вида, и, в основном, осушка более губительна, чем заморозка.

Число продуцируемых статобластов огромно. Brown (1933) подсчитал, что колонии *Plumatella repens* на растениях на 1 кв.м в Douglas Lake, Мичиган, США могут производить 800 000 статобластов в осенний период. Он нашел дрейфующий пояс 0,3-1,2м шириной у побережья этого озера, состоящий из статобластов, простирающийся на полмили. Колонии, развившиеся из статобластов переживших зиму, быстро приступают к половому размножению, которое происходит только один раз в году. Оно часто отсутствует в северном климате или в альпийских озерах, возможно, из-за короткого сезона роста. Дополнительный тип размножения помимо почкования встречается, например, у *Cristatella*, когда ее колония разделяется на две новые дочерние. Колонии, как правило, в наших широтах переживают только одно лето, хотя иногда в мягком климате могут существовать в течение зимы или зим. При борьбе с обрастаниями гидротехнических сооружений иностранные ученые рекомендуют использовать химическую обработку в период весеннего развития колоний из статобластов. Рекомендация автора проводить такую обработку, в случае, если пропущен весенний период, в период полового размножения мшанок.

Субстратом для мшанок служат камни, водные растения, затонувшая древесина, раковины моллюсков, панцири раков, а также металл, пластмасса, бумага, бетон и другие объекты, подводные сооружения. У Phylactolaemata есть определенная избирательность по отношению к субстрату. Фредерицеллиды селятся на любом субстрате, в том числе и на илах, а высоко организованные плюмателлиды и кристателлиды обитают преимущественно в зарослях макрофитов, на древесных остатках, раковинах моллюсков и камнях.

В наших северных широтах мшанки образуют относительно невысокие биомассы, однако могут играть доминирующую роль в биоценозах. Живые колонии могут весить от нескольких миллиграмм до нескольких килограмм. Нам удалось наблюдать в Ропше в одном из прудов Ропшинской системы (Ленинградская область) *Cristatella mucedo* в необычайно большом количестве (размеры колонии 2-5 см длиной), так что удалось быстро наполнить банку объемом 0,5 л. При этом в месте нахождения оставалось еще большое количество ползающих колоний. *Plumatella fungosa* формирует довольно массивные колонии, как правило, на веточках деревьев или кустарников, погруженных в воду.

Эти фотографии показывают небольшую порцию плюмателлы (Рис. 5А) из водоемов охладителей атомной электростанции в США. В сентябре 2008 года рост и аккумуляция *Plumatella vaihirieae* серьезно угрожали водной охладительной системе электростанции. Водолазы работали круглосуточно в течение пяти дней, и соскобленные мшанки размещались на ближайшем поле (Рис. 5Б).

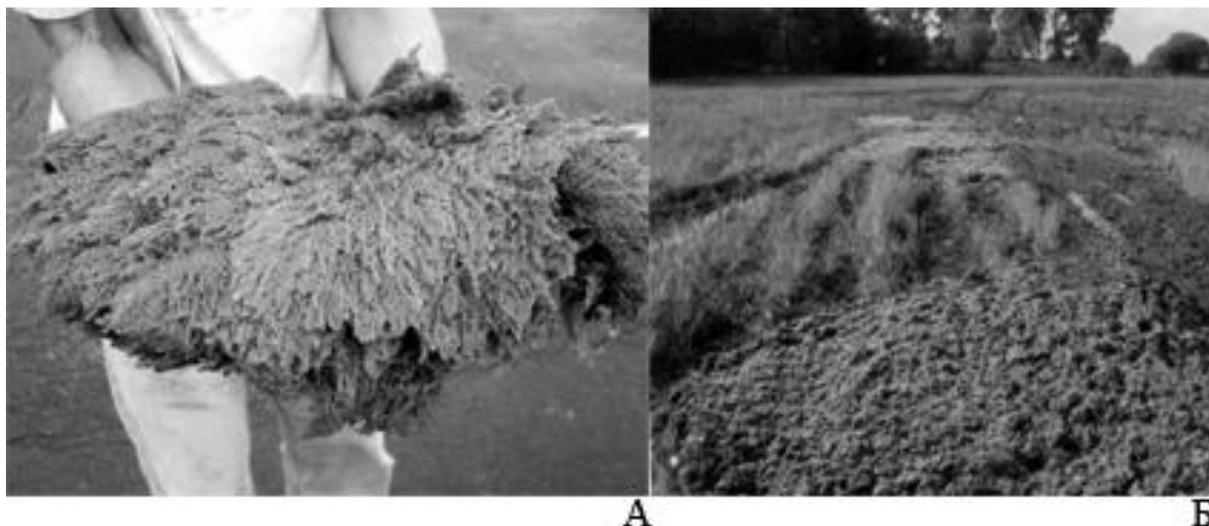


Рис.5. А и Б (на поле)-*Plumatella vaihiriae*.

Пища пресноводных мшанок состоит из крошечных организмов, таких как бактерии, диатомовые водоросли, ротатории, десмиды, и другие одноклеточные водоросли, простейшие, мелкие ракообразные. В питании *Plumatella fungosa* были отмечены почти 40 мелких планктонных организмов в месте обитания этого вида, главным образом, десмиды, зеленые флагаелляты, ротатории и мелкие ракообразные. Коловратки и ракообразные могут сбегать из колоний мшанок при помощи энергичных движений и часто не могут быть проглочены из-за их размера. В связи с прозрачностью стенок полипида цвет пищи может определять их окраску. Кроме того, окраска наблюдается в случаях симбиоза с бактериями и синезелеными водорослями.

Подобно другим прикрепленным животным, колонии *Phylactolaemata* служат местом для прикрепления и обитания многочисленных мелких животных, таких как простейшие, гидры, планарии, коловратки, гастротрихи, нематоды, копеподы, аннелиды, тардиграды, и личинки насекомых. Мшанки могут срастаться с пресноводными губками. Личинки хирономид одни из наиболее постоянных партнеров колоний филактолемат. Многие из квартирантов *Phylactolaemata* также их постоянные враги, питающиеся полипидами и статобластами. Полипиды едят плоские черви, аннелиды, улитки, орибатиды и личинки насекомых. Личинки хирономид - самые худшие враги, собирающиеся на колониях в орды и питающиеся не только полипидами, но и статобластами, которые они разрушают своим грызущим ротовым аппаратом.

В прошлом *Phylactolaemata* часто вступали в прямые экономические отношения с человеком как нарушители в городской водной системе. Не только трубы становились забитыми растущими эктопротками («трубный мох») и ордами сопровождающих их питающихся детритом и фильтрующих животных, но фрагменты разрушенных колоний блокировали водные решетки и счетчики. Возможно, с установкой в наше время более эффективной системы фильтров таких трудностей не возникает. *Phylactolaemata* могут иметь практическое значение для человека, так как очищают воду от микроорганизмов. Они служат пищей личинкам хирономидам, которые в свою очередь потребляются рыбами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. В.И. Гонтарь, А.В. Виноградов. Тип Мшанки (Bryozoa)// Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Низшие беспозвоночные.- Санкт-Петербург, 1994. Том.1. С. 140-144, табл. 105-111.
2. V. I.Gontar, Naakon Hop, A.Yu.Voronkov. Bryozoa as environmental bioindicators in
3. Kongsfjorden, Svalbard// Proceeding of Zoological Institute of Academy of Sciences.-Санкт-Петербург, 2002.V.296. P.53-62.
4. Brown C.J. A Limnological Study of Certain Fresh-Water Polyzoa with Special Reference to Their Statoblasts//Transactions of American Microscopical Society. 1933.52 (4). P. 271-316.

5. V.I.Gontar, H.Hop, A.Yu.Voronkov. The concept of territoriality for bryozoa// Proceeding of Zoological Institute of Academy of Sciences. Санкт-Петербург, 2004. V.300. P. 99-108.
6. Kraepelin K. Die deutschen Süßwasserbryozoen. I. Anatomisch-systematischer Teil//
7. Abhandlungen aus dem Gebiet der Naturwissenschaft hrsg. vom Naturwissenschaft Verein, Hamburg.1887. 10. 168P.

LIFE STRATEGIES OF BRYOZOA IN FOULING.

Gontar V.I.

*Zoological Institute RAN, University Quay, 1, Saint Petersburg, 199034, Russia,
e-mail:gontarvi@gmail.com*

Bryozoa as fouling organisms often play the dominant role in water communities and widespread in the continental basins. Phylactolaemata representatives inhabit freshwater environments and few Gymnolaemata species also can found in it. They can be presented either by colonies, or by asexually produced encapsulated bud. Mode of life of freshwater bryozoan colonies and their distribution depends on environmental condition.

СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ БЛАГОПОЛУЧИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ И ЭКОСИСТЕМ

В.В. Грубинко

*Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка, ул. М. Кривоноса,
2, Тернополь, Украина
e-mail: v.grubinko2@yahoo.com*

Традиционно для оценки экологической успешности организмов и популяций, а также состояния биоценотической среды, используют видовое разнообразие и продуктивность (Протасов, 2002). О степени их уязвимости делают вывод по показателям снижения численности и биомассы доминантного вида (видов), не учитывая при этом биологических характеристик организмов. Антропогенное влияние на экосистемы приводит, как правило, к снижению этих показателей и в результате – к элиминации видов, чувствительных к неблагоприятным факторам, и к увеличению численности толерантных видов. Поэтому показатель видового разнообразия не всегда характеризует состояние экосистем, поскольку его низкие значения типичны не только для загрязненных районов, но и для территорий, где доминирует один вид (Лосовская, 2002). Биоразнообразии для оценки трансформации среды важно не само по себе, поскольку нет

При действии неблагоприятных факторов в процессах, развивающихся по пороговому принципу, причинно-следственная связь между фактом действия и развитием процесса носит безусловный характер: при действии фактора в дозах, ниже определенных уровней, патологический процесс не развивается, а при достижении определенной дозы, процесс развивается непременно; в процессах, развивающихся по беспороговому принципу, причинно-следственные связи между фактом действия и развитием процесса носят вероятностный характер: эффект проявляется при действии даже одного физического или химического носителя фактора, вместе с тем процесс может и не развиваться, не принимая во внимание значительные дозы. Поэтому повреждение, в зависимости от механизма действия фактора, многовариантно (флуктуационное) и носит цепной, взаимозависимый, подчиненный, пролонгированный, в итоге – целостный (системный) характер (Гандзюра, Грубинко, 2008). Изменения, которые вызываются действием неблагоприятного фактора, на уровне клетки проявляются в: структурных повреждениях молекул и надмолекулярных структур с накоплением новообразований; недостаточном образовании и снабжении клетки энергетическими и восстановительными эквивалентами; нарушении систем, регулирующих скорость и направленность метаболизма; нарушении взаимодействия макромолекул, клеток, тканей и органов, увеличении количества случайных и нерегулированных взаимодействий; нарушении физиологических процессов, гомеостаза (постоянство состава) и энантиостаза (постоянство функций); отклонении поведенческих и психо-физиологических реакций на

действие значимых факторов (рис. 1). Отклонения на экосистемном уровне проявляются в: снижении численности популяций вплоть до полного исчезновения видов; изменении ареала и плотности популяций; появлению инвазивных видов и развитие экотонизации территорий; изменении структуры сообществ – возрастание части пациентов и эксплерентов, снижение доли виолентов, изменении соотношения фито- и зоофагов; смене доминирования; уменьшении биоразнообразия; снижении эффективности трансформации вещества и энергии; изменении продукции и ускорении климакса экосистем; нарушении информационной структуры экосистем; нарушении биогеохимических циклов (рис. 2).

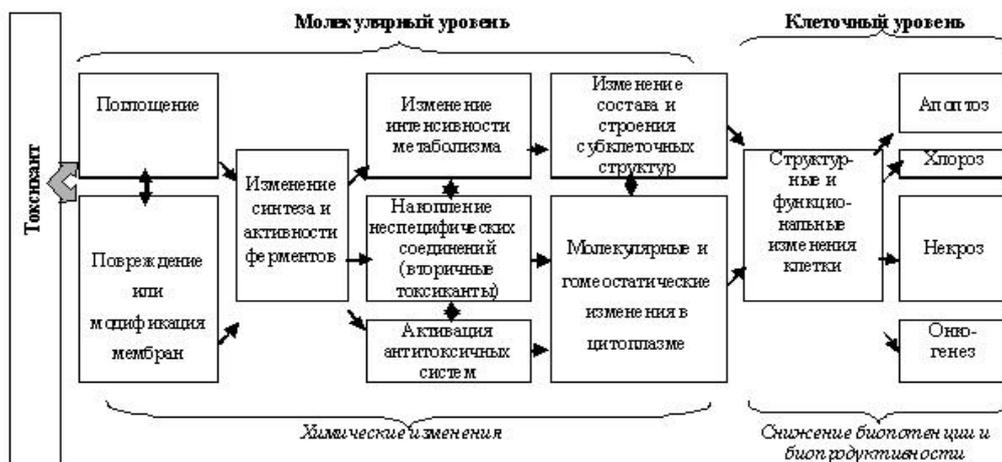


Рис. 1. Схема развития интоксикационного поражения в клетке



Рис. 2. Схема развития интоксикационного поражения в экосистеме

Прежде всего выражением комплексной реакции живой системы в условиях повреждения является потеря достаточного уровня энергетического (термодинамического) статуса. С точки зрения равновесной термодинамики последний описывается изменением энтропии (S), которая определяется суммарной величиной поглощенных системой приведенных теплот (Q/T). При этом оценивают начальное и конечное состояние системы, а направленность процесса определяется разницей параметров в этих состояниях: $\Delta S = \frac{\Delta Q}{\Delta T}$. Увеличение энтропии означает уменьшение степени упорядоченности и организованности в системе. В действительности, осложнение и увеличение упорядоченности биологических структур в период их роста и формирования сопровождаются уменьшением, а не увеличением энтропии. Как пример можно рассмотреть поток, известный как материально-энергетический баланс экосистемы (Ганджюра, Грубинко, 2008). Внешняя энергия, которая поступает в экосистему, распределяется как минимум на три части: часть фиксируется продуцентами; часть тратится на метаболизм и выполнение механической работы системы. Эти формы энергии обеспечивают устойчивость и воспроизводимость носителей "явления жизни как формы существования материи". Часть энергии в экосистемах не усваивается. Энергия, которая фиксируется и распределяется в результате превращения в трофической цепи, способствует формообразованию компонентов

системы. Согласно с И. Пригожиным (1991) энергия формообразования (σ) является фиксированной ("внутренней") энтропией, "скрытой" в организации живых структур. Поэтому при оценке системы важен не столько показатель биологической продукции, а поток энтропии и ее фиксирование как следствие формообразования (Пригожин, 1991): $\Delta S = \sigma + \frac{\Delta Q}{AT}$

В связи с непрерывным флуктуированием живых систем (Князева, Курдюмов, 1992) возникает вопрос об оценке их устойчивости. Исходя из вышеизложенного параметрами ее оценки можно считать энергию формообразования, увеличение многообразия элементов, динамику дискретно-континуального перехода.

Из изложенного вытекает общая проблема – качественная и количественная оценка общего эффекта действия фактора на живые системы. Речь должна идти не о качественном или количественном изменении отдельного параметра или функции, а о системной потере биологического или экологического качества системы в целом, что можно выразить в нанесенном ей вреде. Интегральные изменения такие (Гандзюра, Грубинко, 2008):

1. Нарушение энергетических и информационных процессов системы в целом (уменьшение "организованного взаимодействия").

2. Нарушения энергетического и субстратного баланса на метаболическом уровне (нарушение гомеостаза системы).

3. Неадекватность физиолого-биохимических реакций – нарушение реакции и обратных связей в системе и ее функциональной целостности: рост, размножение, гетерогенность, продукция, развитие, эволюция.

4. Нарушение способности живых систем к адаптациям в измененных условиях - трансформация диссипативно-континуальной динамики систем (как следствие предыдущих) и межсистемного взаимодействия.

В целом они формируют структурно-функциональную устойчивость системы во времени и ее функциональную успешность – эквифинальность (рис. 3).



Рис. 3. Схема формирования успешности био-, эко- системы

При этом возникает проблема количественной интерпретации благополучия. В агроэкологии, сельскохозяйственном производстве и экологии в целом в последнее время широко пользуются понятием "вредность" ("harmfulness") (Гандзюра, Грубинко, 2008). В него вкладывают определенный уровень негативного влияния фактора (-ов) на систему, которое ведет к снижению ее продуктивности. Трактуют "вредность" как потерю биологической продукции (экологическая категория), но оценивают как экономическую категорию – количество и качество продукции, в конечном счете – снижение прибыли (убыточность).

Исходя из вышеизложенных принципов, благополучие можно оценивать в относительных единицах в пределах от 1 или 100% (максимальное значение благополучия – достижение эквифинальности) до 0 (прекращение существования системы). Ранжируя функцию благополучия системы в процентах референтного (естественного) состояния системы (принимается за 100%), можно количественно оценить вредность "harmfulness" действия

факторов среды по снижению благополучия (недостижение эквифинальности): $H_f = 1 - Df$ (determining function).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гандзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2008. 144 с.
2. Князева Е.Н. Курдюмов С.Н. Синергетика как новое мировидение: диалог с И. Пригожиным // Вопросы философии. 1992. № 12. С. 3–20.
3. Лосовская Г.В. Мониторинг качества воды Черного моря по макрозообентосу (обзор) // Гидробиол. журн. 2002. Т.38, №1. С. 50–61.
4. Пригожин И. Философия нестабильности // Вопросы философии. 1991. № 6. С. 46–52.
5. Протасов А.А. Биоразнообразие и его оценка. Концептуальная диверсикология. Киев, 2002. 105 с.

APPROACH OF THE SYSTEMS TO ESTIMATION OF PROSPERITY OF AQUATIC ORGANISMS AND ECOSYSTEMS

V.V. Grubinko

A concept “diversity” is examined as complex heterogeneity (genetic, morphological, functional from the physiological and biocenotic points of view of different quality, population changeability, specific riches, ekotonic quality), and in a concept the “productivity” – ability of the system due to providing of functioning as possible greater amount and speed of inner loops which form the stream of energy of certain capacity and speed in it, to fix internal energy as a result of variety of forms of certain amount and complication (formation of structures as a result of quantitative and high-quality development of the system).

Offered at the estimation of the state of bio-, eko- systems to examine their heterogeneity and productivity in concrete spatio-temporal limits as such, which provide stability of steady-state (discrete state) and accumulation of potential for the continual passing to new quality, as a result existence of the system is provided in a evolution process, formed it ekvifinalic as integral property of expedience of existence.

СОДЕРЖАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ГРУНТАХ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ ПРИДОННОГО СЛОЯ ВОДЫ

Л.В. Дегтярева, Н.В. Карыгина

Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства,

Астрахань, Россия

E-mail: astvrtan@mail.ru

Северная часть Каспийского моря характеризуется мелководностью и высокой биологической продуктивностью (Салманов, 1999). Из всех известных экологических опасностей, угрожающих стабильности функционирования экосистемы Каспийского моря, наибольшей является нарушение кислородного режима (Салманов и др., 2011).

Для кислородного режима Северного Каспия свойственно пресыщение кислородом поверхностного слоя воды за счет интенсивного фотосинтеза. В придонном горизонте в результате расхода на окисление органики его содержание снижается, что может привести к образованию гипоксии (Лобковский и др., 2005; Синельников и др., 1994). Низкое содержание кислорода обычно является показателем неблагоприятных экологических условий в водоеме и указывает на органическое загрязнение (Токсикозы рыб с основами патологии, 2006).

Нефтяные углеводороды, являющиеся постоянной составляющей органического вещества и наиболее характерными загрязнителями Каспийского бассейна, легко сорбируются взвесями в силу своих гидрофобных свойств и при седиментации попадают в донные осадки (ДО) (Немировская и др., 2008). Анализ современного содержания углеводородов в ДО дает объективную оценку загрязнения за продолжительный период времени (Московченко, 2005).

Целью работы являлась оценка современного уровня содержания органических соединений (органического углерода и экстрагируемых нефтяных углеводородов) в грунтах Северного

Каспия, пространственно-временная динамика их концентраций, а также изучение влияния данных веществ на кислородный режим придонного слоя воды.

Работы проводились в российском секторе Северного Каспия в 2010 г. При выполнении исследований был проведен анализ 63 проб донных осадков и воды в придонном горизонте. Кислород определялся методом Винклера, гранулометрический состав грунтов – по ГОСТ 12566-79, органический углерод – методом Тюрина, нефтяные углеводороды – флуорисцентным методом.

Основным типом ДО западной части Северного Каспия являются различной крупности пески с примесью ракуши. Заиленные пески залегают в восточной части предустьевоего пространства р. Волги, алевритовые илы – близ о. Малый Жемчужный и в районе западной волжской струи, ракушечные отложения и оолиты – на востоке границы со Средним Каспием.

Уровень накопления органического углерода ($C_{орг}$) в ДО изменялся от 0,08 до 2,82 %. Содержание $C_{орг}$ находилось в прямой корреляционной зависимости с процентом алевритовой ($r=+0,56$; $n=18$; $p < 0,05$) и пелитовой ($r=+0,69$; $n=18$; $p < 0,05$) фракций грунта. Вследствие этого наибольшее количество $C_{орг}$ найдено в более тонкодисперсных грунтах.

Содержание ЭНУ составляло в среднем 6,4 мкг/г сухого грунта. Разброс данных был существенным – от 2,1 (в песчаных грунтах с обломками ракушечного материала) до 64,5 мкг/г сух. гр. (в мелкозернистых песках с примесью илистой фракции). В большинстве проб (77,4 %) концентрации варьировали в узком диапазоне 3,5-8,1 мкг/г, который и определял фоновое содержание токсикантов в осадках. Для ЭНУ не было выявлено достоверной связи с процентом пелитов, но при переходе от песчано-ракушечных осадков к заиленным пескам содержание углеводов, как правило, возрастало.

Между содержанием $C_{орг}$ и ЭНУ в осадках была выявлена умеренная положительная связь. Коэффициент корреляции варьировал от +0,64 (июнь) до +0,72 (август).

Относительное содержание кислорода в придонном горизонте воды изменялось от 34 до 175 %. Образование дефицита кислорода (менее 80 %) отмечалось на отдельных участках акватории и было вызвано термохалинной стратификацией водных масс.

Сезонная динамика характеризовалась высоким насыщением придонных вод кислородом в начале летнего периода на фоне активизации фотосинтетической деятельности. В этот же период, в результате сезонных отложений органики в ДО, увеличилась концентрация $C_{орг}$. Интенсивность накопления ЭНУ возросла к концу лета. Осенью, вследствие развития минерализации, наблюдалось снижение концентраций органических веществ. Расход кислорода на окисление органического материала обусловил осеннее снижение его относительного содержания (рис. 1).

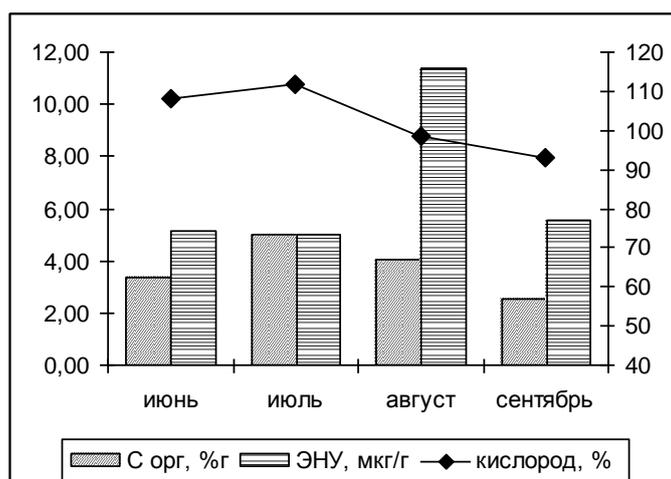


Рис. 1. Сезонная динамика содержания органических соединений в ДО и кислорода в придонном слое воды

Пространственное распределение исследуемых органических соединений характеризовалось максимальным накоплением в осадках, залегающих в мелководном районе, находящимся под влиянием стока западных рукавов р. Волги, в зоне смешения морских и

пресных вод, где флокулируют и выпадают в осадок тонкие взвеси речного стока, на которых сорбируется растворенная органика. Минимальными показателями отличался центральный приглубый район с незначительным содержанием взвешенных веществ и песчано-ракушечными донными отложениями. В этом районе на больших глубинах преобразование органического вещества протекает дольше, в результате чего в осадки поступает органический материал, обедненный углеродом. Углеводороды, особенно высокомолекулярные, здесь, в условиях морского гидролого-гидрохимического режима, остаются преимущественно в растворенной форме, их седиментация затруднена.

Районирование акватории по батиметрическим показателям на пять зон (от <3 м до >12 м) выявило снижение насыщения придонных вод кислородом с глубиной (рис. 2а), при этом пик накопления органического материала в ДО наблюдался на глубинах 5-6 м (рис. 2б).

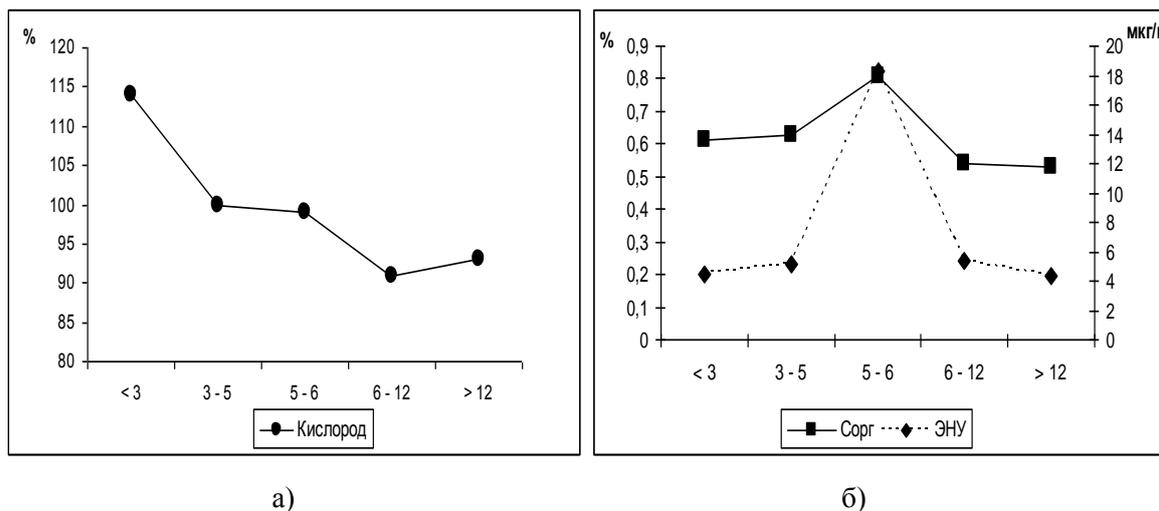


Рис. 2. Распределение кислорода в придонном горизонте воды (а) и органических соединений в ДО (б) по глубинам (м)

Следовательно, расход кислорода на окисление растворенной органики в водной толще приводит к его снижению по мере увеличения глубины. Наиболее активное осаждение органических соединений происходит на свале глубин, служащем своеобразным барьером в распространении органического вещества.

Корреляционный анализ данных за летний период не выявил достоверной отрицательной связи между содержанием кислорода в придонном горизонте воды и уровнем накопления в грунтах $C_{орг}$ и ЭНУ. Отсутствие зависимости объясняется тем, что в 2010 г. в условиях аномально высоких температур воды окисление легкоминерализуемой органики протекало, в основном, в поверхностном слое воды. Органические вещества, поступившие в ДО, представляли собой более стойкие соединения, и их содержание не повлияло на расход кислорода у дна.

В осенний период, при преобладании деструкционных процессов, обнаружена корреляционная зависимость между содержанием $C_{орг}$ и процентным содержанием кислорода ($r = -0,73$; $p < 0,05$; $n = 26$).

Таким образом, содержание органических соединений ($C_{орг}$ и ЭНУ) в донных отложениях Северного Каспия даже при невысоком уровне накопления оказывает влияние на изменение кислородного режима придонного слоя воды и приводит к образованию дефицита кислорода. Это может оказать негативное воздействие на функционирование некоторых классов донных сообществ, высоко чувствительных к изменениям абиотических факторов среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобковский Л.И., Левченко Д.Г., Леонов А.В., Амбросимов А.К. Геоэкологический мониторинг морских нефтегазоносных акватории. М. Наука. 2005. 326 с.
2. Московченко Д.В. Нефтепродукты в донных отложениях водных источников Ханты-Мансийского автономного округа // Водные ресурсы. 2005, Т.32. №1. С.85-89.

3. Немировская И.А., Бреховских В.Ф. Генезис углеводородов во взвеси и донных осадках северного шельфа Каспийского моря // *Океанология*. 2008, Т.48. №1 С. 48-58.
4. Салманов М.А. Экология и биологическая продуктивность Каспийского моря. Баку. 1999. 400 с.
5. Салманов М.А., Гусейнов А.Т., Алиев Р.Э. Изучение мониторинга продукционно-деструкционных процессов и экологической ситуации в Каспии за последние 50 лет // *Материалы IV Международной конференции*. Астрахань. 2011. С. 203-206.
6. Синельников В.Е., Либерман А.Ш. О факторах, влияющих на содержание перекиси водорода и других окислителей в природной воде. // В кн. *Биогенные элементы и органическое вещество в водохранилищах*. Рыбинск. 1994. С.27-40.
7. Токсикозы рыб с основами патологии. С.-Пб.: ГОСНИОРХ. 2006. С 96-100.

CONTENT OF ORGANIC COMPOUNDS IN SEDIMENTS OF THE NORTHERN CASPIAN AND THEIR IMPACT ON OXYGEN REGIME IN THE NEAR-BOTTOM WATER LAYER

L.V. Degtyareva, N.V. Karygina

Investigation of the content and spatio-temporal distribution of organic carbon and petroleum hydrocarbons in sediments of the western part of the Northern Caspian was made. From the results obtained their impact on changes in oxygen regime in the near-bottom water layer was determined. Area zoning and correlation analysis of data were performed.

ЦИКЛ МЕТАНА И ДЕСТРУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ДОННЫХ ОСАДКАХ ТЕХНОГЕННЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

А.Н. Дзюбан

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия
e-mail: microb@biw.yaroslavl.ru*

Бактериальное населения донных отложений (ДО) водоемов играет важную роль в процессах «самоочищения», поскольку в отложениях микробной деструкции подвергаются как природные трудноминерализуемые вещества, так и токсичные для других гидробионтов соединения, поступающие с бытовыми и хозяйственными отходами. Однако с увеличением антропогенной нагрузки в иловом распаде органического вещества (ОВ) увеличивается роль анаэробных процессов, что может привести к серьезным негативным последствиям для водоемов (Дзюбан, 2006). Особый интерес представляет изучение деструкции ОВ в осадках техногенных водных объектов (ТВО).

Работы проводили на ряде ТВО: Водоем-накопитель Амурского целлюлозного комбината (АЦБК), рр. Серовка и Ягорба в зоне г. Череповца, отстойник Костромской ГРЭС (КГРЭС) (табл. 1). Физико-химические характеристики воды и ДО, также интенсивность микробных процессов метаногенеза (МГ), окисления CH_4 (ОМ), сульфатредукции (СР), темновой ассимиляции CO_2 (ТА) определяли по описанным методикам (Романенко, 1985; Кузнецов, Дубинина, 1989; Дзюбан, 1999).

Таблица 1. Общая характеристика техногенных водных объектов

| Название ТВО | Площадь км ² | Глубина, м (макс.) | Содержание в воде (пов/дно) | |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------|----------------------|
| | | | O ₂ , мг/л | CH ₄ мл/л |
| Водоем-накопитель АЦБК | 1.2–7.2 | 9–16 | 1.5 / 0 | 2.7 / 4.5 |
| Устье р. Серовки | < 0.001 | < 0.5 | 3–4 / – | 0.07 / – |
| Участок р. Ягорбы у ФМК | ~ 0.005 | 2.8 | 6.5 / 4–5 | 0.06 / 0.2 |
| Отстойник КГРЭС | 0.05 | 3.5 | 7.6 / 6–7 | – |

Примечание: ФМК – Фанерно-мебельный комбинат.

Обследованные водные объекты существенно различались по многим морфологическим и технологическим характеристикам. Однако для всех ТВО присуще весьма важное общее свойство – накопление в донных осадках трудноминерализуемых отходов производства (в том

числе токсичных), среди которых имеются различные восстановленные соединения. Последнее ведет к резкому снижению окислительно-восстановительного потенциала (Red/Ox) в среде, влияющего на структуру и функционирование бактериоценозов.

Водоём-накопитель переработанных сточных вод АЦБК в г. Амурске (Хабаровский край) представляет собой специфическую озерную экосистему. Исследования, проведенные 26.09–03.10 1991 г., показали, что в условиях гомотермии водные массы водоема-накопителя по физико-химическим критериям достаточно однородны. Имея высокие показатели цветности (~500⁰ хромово-кобальтовой шкалы) и обеспеченности $C_{орг}$ (~700 мг С/л), они по всей глубине содержали метан (2.7–4.5 мл/л), а концентрация O_2 лишь у самой поверхности составляла 1.3–1.5 мг/л (Дзюбан, 2002б).

Дно водоема-накопителя покрыто глубоко восстановленными грубодетритными осадками богатыми $C_{орг}$. В непосредственной близости от коллектора они жидкие и газифицирующие, у другого берега – плотные. В «молодых», газифицирующих илах доля $C_{лаб}$ вдвое выше, чем в «старых» плотных. Концентрация в осадках сульфатов повсюду очень высока, особенно в «старых» ДО, где она достигала 680 мг $SO_4^{-2}/дм^3$ (табл. 2).

Таблица 2. Физико-химическая характеристика донных осадков различных техногенных водных объектов в слое 0–2 см ($C_{лаб}$ – лабильные фракции $C_{орг}$)

| Водный объект и участок | Внешний вид грунтов | Eh, мВ | $C_{орг}$, г/дм ³ | $C_{лаб}$, % $C_{орг}$ | CH_4 , мл/дм ³ |
|--------------------------|----------------------------------|--------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Накопитель АЦБК, центр 1 | Черный газифицирующий ил | -90 | 23 | 10 | 110 |
| Там же, центр 2 | Черный плотный ил | -100 | 21 | 6 | 26 |
| Там же, побережье | Черный газифицирующий ил | -90 | 28 | 10 | 133 |
| Устье р. Серовки | Черная вязкая масса | -90 | 63 | 6 | 10.1 |
| Р. Ягорба у ФМК | Грубодетритный газифицирующий ил | -5 | 54 | 8 | 156 |
| Отстойник ГРЭС, 1 | Серый детритный ил | 20 | 16 | 22 | 55 |
| Там же, 2 | Черный ил | -90 | 12 | 17 | 4.5 |

Специфические свойства осадков обусловили формирование в них преимущественно анаэробного бактериобентосного сообщества (Дзюбан, 2002б). При этом неоднородность ДО на отдельных участках водоема-накопителя отразилась как на составе доминирующих микробных групп, так и на функционировании бактериоценозов.

На основной площади дна водоема-накопителя деструкция ОВ протекала исключительно анаэробным путем (табл. 3). В богатых $C_{лаб}$ газифицирующих илах, где по нашим данным преобладали анаэробные сапрофиты и метаногены, интенсивность микробных процессов метаногенеза достигала уровня гипертрофных озер и являлась основным терминальным звеном анаэробного распада ОВ. В «старых» же осадках удаленной от поступления сточных вод зоны, где содержание сульфатов было максимальным, и где доминировали сульфатвосстанавливающие бактерии (Дзюбан, 2002), основная роль в распаде ОВ принадлежала уже сульфатредукции, достигавшей 24 мг S/ (дм³ сут).

Таблица 3. Интенсивность процессов деструкции ОВ ($D_{аэр}$ – аэробная минерализация, $D_{ан}$ – анаэробный распад по выделению CO_2) в донных осадках различных ТВО

| Водный объект и участок | $D_{аэр}$ | $D_{ан}$ | МГ, 0–2 см | ОМ, 0–1 см | СР, 0–2 см | ТА, мг С/ (дм ³ сут) |
|-------------------------|--------------------------|----------|---|------------|------------|---------------------------------|
| | г С/(м ² сут) | | мл CH_4 (мг S)/ (дм ³ сут) | | | |
| Накопитель, центр 1 | 0 | 0.14 | 41 | 0 | 6.7 | 43 |
| Там же, центр 2 | 0 | 0.18 | 9.6 | 0 | 24 | 22 |
| Там же, побережье | 0.05 | 0.22 | 40 | 0 | 2.9 | 31 |
| Устье р. Серовки | 0.05 | 0.12 | 17 | 0.5 | 12 | 21 |
| Р.Ягорба у ФМК | 0.18 | 0.14 | 24 | 16.9 | 0.07 | 50 |
| Отстойник КГРЭС, 1 | 0.22 | 0.18 | 5.6 | 2.2 | 0.21 | 7,2 |
| Там же, 2 | 0.12 | 0.24 | 3.5 | – | 3.6 | 1.7 |

Река Ягорба и ее приток р. Серовка, расположенные в промышленной зоне г. Череповца, испытывают очень сильное антропогенное воздействие (Dzyuban et al., 1996; Дзюбан, 2003), однако источник и состав поступающих в них загрязнений различен.

Небольшая мелководная речка Серовка служит сбросным коллектором разнообразных отходов Череповецкого металлургического комбината, среди которых имеются как соединения технического производства, в том числе битумоиды и нефтепродукты, так и лабильные ОВ. Ее осадки представляют черную массу с резким запахом, где концентрация сульфатов достигала 100–900 мг $\text{SO}_4^{-2}/\text{дм}^3$, а содержание общего $\text{C}_{\text{орг}}$ – 64 мг $\text{C}/\text{дм}^3$ (табл. 2), что намного выше, чем в илах продуктивных водоемов (Дзюбан, 1999).

Благодаря перемешиванию вод и малой глубине речки концентрация O_2 у дна в период «открытой воды» не падала ниже 2.5–4 мг/л, однако Red/Ox осадков даже в самом поверхностном слое был весьма низок (табл. 2). Последнее, в сочетании с особенностями состава органико-минерального комплекса, благоприятствует функционированию в них анаэробного бактериоценоза, и распад ОВ в осадках р. Серовки шел в основном анаэробным путем. При достаточно энергичном метаногенезе преобладали процессы сульфатредукции (табл. 3), которые имеют энергетическое преимущество (при доступности сульфатов) в конкуренции за лабильные ОВ.

На р. Ягорбе был обследован участок сброса стоков фанерно-мебельного комбината, привносящих фенолы, смолы и большое количество древесных отходов. Благодаря перемешиванию вод содержание O_2 у дна составляло в период наблюдений 4–5 мг/л, но уже поверхностные слои грубодетритной массы осадков обладали восстановленными свойствами (табл. 2). Сочетание условий – обеспеченность $\text{C}_{\text{орг}}$, приток O_2 и низкий Red/Ox – способствовало активному функционированию в ДО всего сложного микробного сообщества. Деструкция ОВ протекала здесь как за счет аэробных, так и анаэробных процессов. Причем особая роль в них принадлежала отдельным звеньям цикла метана, интенсивность же сульфатредукции оказалась очень низкой (табл. 3).

Отстойник Костромской ГРЭС, принимающий разнокачественные отходы, имеет зоны с различными характеристиками грунтов (Дзюбан и др., 2001). На участке влияния бытовых сточных вод сформировались богатые $\text{C}_{\text{ув}}$ и насыщенные метаном илы, поверхностные слои которых обладают слабо-окисленными свойствами. В зоне массивированного поступления техногенных отходов, содержащих нефтепродукты, кислоты, сульфаты, находятся черные восстановленные отложения (табл. 2), где концентрация сульфат-иона составляла 25–80 мг $\text{SO}_4^{-2}/\text{дм}^3$. Исследования интенсивности микробной деструкции на этих участках выявили существенные различия. На первом из них активно протекали как аэробные, так и анаэробные процессы утилизации ОВ с преобладанием метаногенеза. На втором – распад органического вещества осуществлялся только анаэробным бактериальным сообществом и здесь преобладали процессы сульфатредукции (табл. 3).

Ранее было показано, что при традиционной оценке общей деструкции ($D_{\text{общ}}$) в илах по выделению ими в придонную воду CO_2 возможно существенное занижение результатов из-за реассимиляции метаболической CO_2 (РА), особенно в сильно загрязняемых ДО с мощным метаногенезом (Дзюбан, 1999). В настоящей работе сделан расчет максимально полной или суммарной деструкции ($D_{\text{сум}}$) в осадках с учетом реассимиляции CO_2 при бактериальной ТА (C/CO_2 ТА) и при автотрофном метаногенезе. Поскольку на долю последнего в различных водоемах приходится около 50% от общего МГ (Беляев и др., 1979), суммарную деструкцию определяли по формуле:

$D_{\text{сум}} = D_{\text{общ}} + \text{C}/\text{CO}_2 \text{ ТА} + 1/2 \text{ C}/\text{МГ}$, где $\text{C}/\text{МГ}$ – расход $\text{C}_{\text{орг}}$ на продукцию метана под 1 м^2 . Исходя из этого, полную анаэробную деструкцию ($D_{\text{ан-п}}$) определяли как:

$$D_{\text{ан-п}} = D_{\text{сум}} - D_{\text{аэр}}$$

Для более углубленного представления о соотношении в осадках ТВО отдельных звеньев деструкции были выполнены расчеты по стехиометрическим уравнениям (Adams, van Eek, 1988) расхода $\text{C}_{\text{орг}}$ при метаногенезе и сульфатредукции. А также сделаны оценки части анаэробного распада ОВ, осуществляемого другими бактериальными группами – помимо МГ и СР ($D_{\text{ан}2}$): $D_{\text{ан}2} = D_{\text{ан-п}} - (\text{C}/\text{МГ} + \text{C}/\text{СР})$, где $\text{C}/\text{СР}$ – расход $\text{C}_{\text{орг}}$ на сульфатредукцию под 1 м^2 (табл. 4).

Таблица 4. Валовые оценки микробных процессов и расчет суммарной деструкции ОВ в донных осадках различных ТВО

| Водный объект и участок | Расход $C_{орг}$, г/(м ² сут) | | $D_{сум}$ | $D_{аэр}$ | $D_{ан-п}$ | $D_{ан 2}$ |
|-------------------------|---|-------|-----------|-----------|------------|------------|
| | на МГ | на СР | | | | |
| Накопитель, центр 1 | 3.92 | 0.17 | 4.25 | 0 | 4.25 | 0.16 |
| Там же, центр 2 | 0.89 | 0.78 | 1.75 | 0 | 1.74 | 0.07 |
| Там же, побережье | 3.94 | 0.12 | 4.45 | 0.05 | 4.37 | 0.29 |
| Устье р. Серовки | 1.58 | 0.45 | 2.05 | 0.05 | 2.04 | 0.01 |
| Р.Ягорба у ФМК | 2.91 | 0.01 | 3.36 | 0.18 | 3.18 | 0.26 |
| Отстойник КГРЭС, 1 | 0.52 | 0.01 | 1.03 | 0.22 | 0.81 | 0.28 |
| Там же, 2 | 0.34 | 0.14 | 0.60 | 0.12 | 0.48 | 0.05 |

Обследованные ТВО по имеющимся физико-химическим характеристикам вод и ДО можно разделить на слабо-токсичные и высоко-токсичные. К первым отнесены: р. Ягорба у ФМК, отстойник КГРЭС-1 и зона Водоема-накопителя АЦБК с «молодыми» илами. Ко вторым – р. Серовка, отстойник КГРЭС-2, и зона Водоема-накопителя АЦБК со «старыми» илами (Дзюбан, 2002). Во всех из них распад ОВ идет преимущественно анаэробным путем с доминированием метаногенеза. Однако интенсивность отдельных микробных процессов в ДО и их соотношение существенно различаются (рис. 2).

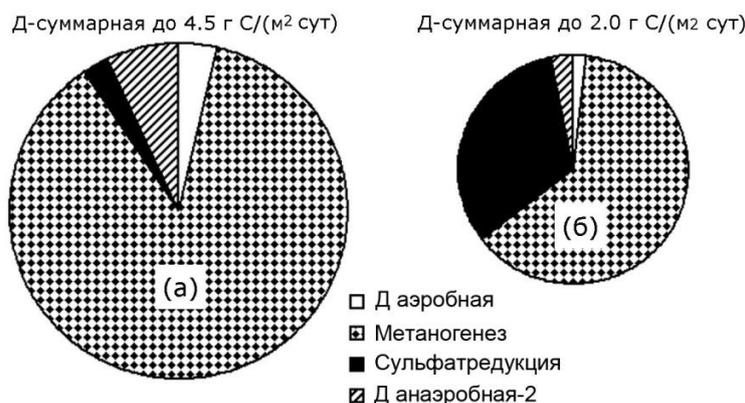


Рисунок. Соотношение отдельных потоков деструкции ОВ в осадках слаботоксичных (а) и высокотоксичных (б) техногенных водных объектов.

В осадках слаботоксичных ТВО микробное сообщество весьма активно и $D_{сум}$ достигает 4.5 г С/(м² сут). Из нее на долю МГ приходится в среднем 87%, на СР – менее 3%, а вклад остальных анаэробов составляет около 7% (рис. 2, а). В отложениях ТВО второй подгруппы, богатых сульфатсодержащими отходами, численность бактериального населения не меньше или даже больше, чем в первой, но его активность в разы ниже. Здесь по усредненным данным тоже преобладает МГ, но доля СР уже достигает 32% от $D_{сум}$, а вклад остальных анаэробов и всего аэробного сообщества чрезвычайно мал (рис. 2, б).

Таким образом, структура бактериальных сообществ донных осадков техногенных водных объектов весьма отличается от иловых сообществ других водоемов, в первую очередь, высокой численностью анаэробов – метаногенов и сульфатредукторов. Такая структура бактериобентоса ТВО и особенности его функционирования обусловлены составом органического комплекса ДО и Red/Ox условиями. В результате распад органических соединений идет здесь практически исключительно за счет анаэробных процессов, а в осадках ТВО накапливаются токсичные продукты микробного метаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Беляев С.С., Лебедев В.С., Лауринавичус К.С. Современное микробиологическое образование метана в пресных озерах Марийской АССР // Геохимия, 1979. № 6. С. 933–940.
2. Дзюбан А.Н. Микробиологические процессы круговорота органического вещества в донных отложениях водохранилищ Волжско-Камского каскада // Водные ресурсы. 1999. Т. 26. № 4. С.

262–271.

3. Дзюбан А.Н. Бактериопланктон и бактериобентос некоторых припойменных озер низовья реки Амур // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 550–557.
4. Дзюбан А.Н. Бактериобентос водохранилищ Верхней Волги как показатель экологического состояния водоемов // Водные ресурсы. 2003. Т. 30. №6. С. 742–749.
5. Дзюбан А.Н. Микробиологическая характеристика донных отложений Верхней Волги в условиях антропогенного воздействия // Биология внутренних вод. 2006. №1. С. 16–23.
6. Дзюбан А.Н., Косолапов Д.Б., Кузнецова И.А. Микробиологические процессы в Горьковском водохранилище // Водные ресурсы. 2001. Т. 28. № 1. С. 47–57.
7. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 286 с.
8. Романенко В.И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л.: Наука, 1985. 295 с.
9. Adams D.D., van Eck G.Th. Biogeochemical cycling of organic carbon in the sediments of the Grote Rug reservoir // Arch. F. Hydrobiol. Ergebn. Limnol. 1988. V. 31. S. 319–330.
10. Dzyuban A., A.Kopylov, D.Kosolapov, J.Krylova, V.Kozlovskaya, T.La Point. Effect of industrial-sanitary savage on benthic microbial communities in the Upper Volga (Russia) // Partnerships for the Environment: Science, Education and Policy. SETAC 17-th Ann. Meeting. Wash. DC. SETAC, 1996. P. 303–304.

CYCLE OF METHANE AND DESTRUCTION IN BOTTOM SEDIMENTS OF TECHNOGENIC WATER OBJECTS

A.N. Dzyuban

Patterns of organic substance destruction in bottom sediments of artificial water objects have been distinguished. It is shown that C_{org} decay occurs anaerobically and is associated with processes of methanogenesis and sulphate reduction.

ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ Н-ЦЕПЕЙ IГ СТЕРЛЯДИ ACIPENSER RUTHENUS

А.Э. Дмитриева, Р.А. Федоров, А.М. Андреева

Институт биологии внутренних вод им.И.Д.Папанина РАН, Борок, Россия

e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru

Суперсемейство белков с Y-образной структурой из двух тяжелых и двух легких цепей, соединенных определенным образом, включает в себя секреторные и мембраносвязанные белки, представленные в виде иммуноглобулинов в биологических жидкостях организма и в виде рецепторов на поверхностных мембранах клеток соответственно. Разнообразие иммуноглобулинов костных рыб ограничено двумя основными классами – IgM и IgG (Mochida et al., 1994; Weinstein et al., 2009; Yasuike et al., 2010). Исследования последних лет выявили у костных рыб более широкий спектр Ig: у костистых рыб, помимо IgM и IgG, описаны секреторируемая и трансмембранная формы IgD (Bergten et al., 2002); IgZ (Danilova et al., 2005); секреторируемая и трансмембранная формы IgT (58 и 63 kDa) (Hansen et al., 2005; Savan et al., 2005); IgE (Ганжа, 2011). У хрящекостных рыб имеются сведения об одном классе - IgM (Litman et al., 1970). Выявленное у стерляди разнообразие субъединиц Y-образных сывороточных белков (от 38 до 130 и выше кДа) (Андреева, 2001) позволило предположить более высокий уровень разнообразия IGH в крови.

Цель исследования – оценить разнообразие тяжелых цепей Ig из сыворотки крови стерляди *Acipenser ruthenus* L. и проверить их принадлежность к IgM с помощью MALDI-TOF – анализа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кровь получали из хвостовых сосудов стерляди, после отстаивания крови получали сыворотку. Для разделения сывороточных неденатурированных белков использовали диск-электрофорез в ПААГ, для разделения N-цепей Ig - 2D-SDS-электрофорез в ПААГ. Величины молекулярных масс MM N-цепей Ig рассчитывали с помощью маркера PageRuler™ Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130 и 250 kDa) Fermentas. Разделенные в 2D-SDS-ПААГ N-цепи Ig вырезали из геля и далее анализировали с помощью технологии MALDI-TOF.

MALDI-TOF использовали для идентификации белков стерляди; анализ выполнен на базе отдела протеомных исследований Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН. Масс-спектры MS были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 % (50ppm). Для получения спектров фрагментации MS/MS использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была 1 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в базе данных NCBI среди белков хордовых с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI считали определенными надежно (p<0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ дифференциации сывороточных белков на SDS-ПААГ.

Сывороточные иммуноглобулины стерляди входят в состав фракции γ -глобулинов. Ранее в этой фракции в неденатурирующих условиях было выявлено четыре белка с Y-образной структурой с MW около 950, 900 и 585 kDa (Андреева, 2001). На SDS-электрофореграмме IGH и IGL локализованы в зоне подвижности γ_2 -глобулинов (Рис.1).

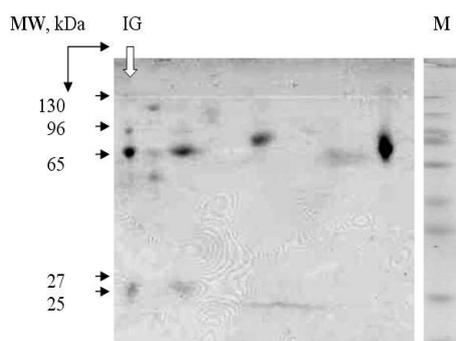


Рис.1. 2D-SDS электрофорез сывороточных белков стерляди. Горизонтальная стрелка показывает направление диск-, вертикальная – SDS-электрофореза; вертикальная светлая стрелка указывает на дорожку иммуноглобулинов IG; маленькие горизонтальные стрелки указывают на субъединицы с молекулярной массой MW около 96, 63, 27 и 25 kDa; M – маркер молекулярной массы PageRuler™ Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130 и 250 kDa) Fermentas.

Полученные на SDS-ПААГ белковые субъединицы с MW около 130, 96, 65, 27 и 25 kDa анализировали с помощью MALDI-TOF-анализа.

2. Анализ масс-спектров MS белков стерляди с MW около 130, 96 и 65 kDa.

Сравнение продуктов трипсинолиза и масс-спектров белков выявило гомологию белков с MW около 96 и 65 kDa (Таблица 1; Рис.2). Поиск гомолога для белка с MW около 130 kDa в NCBI выявил 20 возможных кандидатов, среди которых белков из семейства иммуноглобулинов не обнаружено.

Таблица 1. Продукты трипсинолиза (MW, kDa) белков стерляди с MW около 130, 96 и 65 kDa

| | | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 130 kDa | 638.5194 | 1014.4950 | 1319.7723 | 1615.8053 | 1663.8381 | 1689.8920 |
| | 1707.8629 | 1775.9532 | 1794.8372 | 1820.8633 | 1925.9138 | 1997.0927 |
| | 623.3314 | 637.3134 | 668.3240 | 716.3750 | 882.4174 | 896.4601 |
| 96 kDa | 1004.5775 | 1027.5481 | 1115.5536 | 1244.6991 | 1266.6763 | 1368.7352 |
| | 1390.7263 | 1515.7633 | 1547.7766 | 1638.8252 | 1658.7852 | 1689.9315 |
| | 1733.8793 | 1738.7630 | 1803.9497 | 1883.9221 | 1899.9270 | 1949.0192 |
| | 1963.0296 | | | | | |
| 65 kDa | 716.2815 | 721.2479 | 882.3591 | 1003.4887 | 1027.5207 | 1244.6909 |
| | 1301.6900 | 1324.6601 | 1362.5972 | 1368.7312 | 1397.7889 | 1652.7363 |
| | 1839.8978 | 1949.0378 | 1963.0472 | 1996.8700 | 2232.0971 | 2435.2719 |
| | 3026.4781 | 3218.5856 | 3718.8634 | 3785.9178 | | |

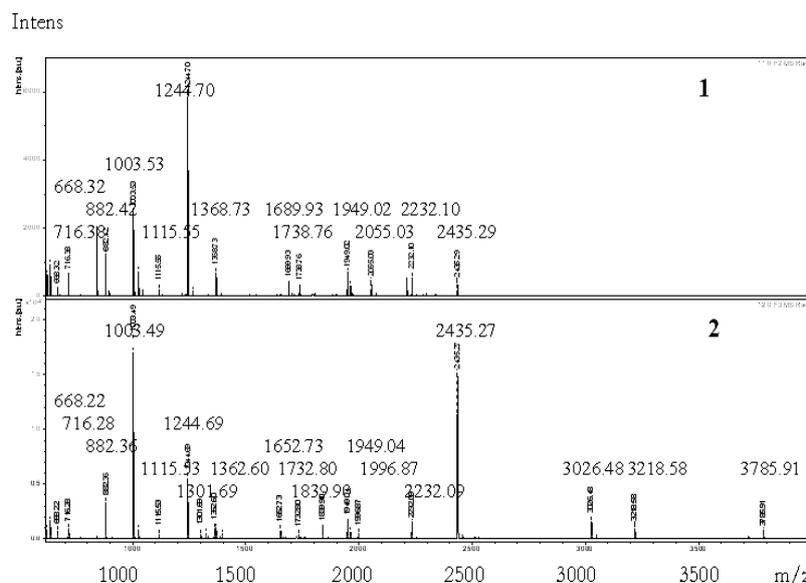


Рис.2. Масс-спектры MS белков стерляди с MW около 96 kDa (1) и 65 kDa (2).

1 T P S L P T V F P L M E A C C L S D I S G P V A T G C L A T E F L P T P A T F S W T D Q T G K A F Q
51 T D K S L Q Y P P V Q P G G T Y T S T G Q L A I S D A E W Q T A E Y F Y C T V E N A S G K N K V K V
101 A K C D P D V T H P H V F I I P P S I E E I R A N K T A T I **V C V A R G F S P K T W S F K W S K D A**
151 V A F D A K R F I N T A A V E D S D K H F S A Y S I L T A T E E E W L G S E I K C E V T F G S A K V
201 F R T I N S T S E P G D C P S K C S V G **I S P P S V E E I F L R K E A T L T C K A T G L V S E D H L**
251 E I K W A S E T K E F E T G T P E I I S V N G Y F T A V S K **L K V T L E E W A R G D K F F C T V K Q**
301 T D S L P S P R V A **A Y H R E L D G P S H R P A V F L L S P S P Q E S T N G N G E V S L T C F V K D**
351 F Y P E E V Y I T W L H S D N S V P Q T F Y T T T N L I P K K N G K P L F S V Y S K L T V P T A Q W
401 T D G G I Y T C V V Y H E T I Q P P T R M I T R N A D S T G **K Q T L V N V G L T L P D K A N P C S N**

Рис. 3. Аминокислотная последовательность IGH (С-регион) русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (NCBI BLAST [gi|82465066](#)), жирным шрифтом выделены участки, гомологичные фрагментам белка стерляди с MW около 96 kDa (NCBI, ACCESSION ABB76147).

Поиск в NCBI гомологов для белка с MW около 96 kDa выявил несколько кандидатов из семейства иммуноглобулинов у *Acipenseridae*: среди них IGH (константный регион) русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, *score* 63 (NCBI, [gi|82465066](#)) (Рис.3) и сибирского осетра *Acipenser baerii*, *score* 54 (NCBI, [gi|2143192](#)); IGH (вариабельный регион) человека *Homo sapiens*, *score* 48 (NCBI, [gi|112696585](#)), что позволяет с большой долей вероятности идентифицировать искомый белок стерляди как тяжелую цепь Ig, несмотря на величину достоверности *score*<84, принятой для определения надежных гомологов ($p < 0.05$). Гомолог белка с MW 96 kDa белок 65 kDa также является IGH (NCBI, [gi|122892442](#)) (Рис.4).

1 M A Q V Q L Q E S G G V V Q P G R S L **R L S C A A S A F T F R S Y G M H W V R Q A P G K G L E W V**
51 **A V I W Y D G S Q K** Y Y A D T V K G R F T I S R D N S K N T **L Y L Q M N S L R A** E D T A V Y Y C A R
101 A S L S D F D Y T A S P W Y Y G L N L W G Q G T M V T V S S

Рис.4. Аминокислотная последовательность IGH (V-регион) человека *Homo sapiens* (NCBI BLAST [gi|122892442](#)). Жирным шрифтом выделены участки, гомологичные фрагментам белка стерляди с MW около 65 kDa (NCBI, ACCESSION ABM67288).

Для подтверждения гомологии белков стерляди и кандидатных белков (IGH русского, сибирского осетров; человека) анализировали их спектры фрагментации MS/MS. Результаты показали, что продукты трипсинолиза фрагментов 1003.5316 и 1244.6991 Da белка стерляди (96 kDa) имеют надежных гомологов среди продуктов трипсинолиза гомологичных фрагментов IGH (64603 Da) сибирского осетра (*score* 163; [NCBI BLAST gi|2143192](#)), (фрагмент белка 49377 Da) русского осетра (*score* 157; [NCBI BLAST gi|82465066](#)) и (фрагмент белка 49456 Da) белуги (*score* 157; [NCBI BLAST gi|82465064](#)). Например, продукты трипсинолиза фрагмента 1003.5316 kDa стерляди – 159.1, 175.1, 201.1, 246.1, 314.1, 415.1, 432.2, 443.2, 544.2, 561.2, 572.2, 690.3, 730.3, 758.3, 829.0 Da – гомологичны соответствующим продуктам трипсинолиза фрагмента 1003.5301 kDa осетра - 158.0924, 175.1190, 201.1234, 246.1561, 314.2074, 415.2551/415.2088, 432.2354, 443.2500, 544.2977/544.2514, 561.2780, 572.2926, 690.3206, 730.3770, 758.3719, 829.4090 Da.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило идентифицировать во фракции γ_2 -глобулинов три типа субъединиц. Одна из них не входит в состав иммуноглобулина; две другие оказались гомологичны друг другу и IGH кандидатных белков с достоверностью ниже принятой для определения надежных гомологов. Факт принадлежности кандидатных белков к тому же семейству (IGH) и принадлежности видов рыб-кандидатов к тому же семейству, что и стерлядь (*Acipenseridae*) позволяет рассматривать IGH русского и сибирского осетра в качестве возможных гомологов исследуемых белков стерляди. Данное допущение подтверждается высоким уровнем параметра достоверности *score* выше 150 сходства MS/MS спектров белков стерляди, с одной стороны, и белков белуги, русского и сибирского осетра, с другой стороны. Таким образом, субъединица IGH стерляди с MW 96 kDa, является тяжелой цепью IgM. Тогда, гомологичная ей цепь с MW около 65 kDa может быть тяжелой цепью как класса M, так и другого класса. Данное обстоятельство позволяет предположить наличие в крови стерляди разнообразия H-цепей в рамках одного класса Ig, а также не исключает наличия Ig другого класса, отличного от IgM.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mochida K., Lou Y.H., Hara A., Yamauchi K. 1994. Physical biochemical properties of IgM from a teleost fish. *Immunology*. V.83:675-680.
2. Weinstein J.A., Jiang N., White R.A., Fisher D.S., Quake S.R. 2009. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. *Science*. 2009. 324(5928):807–810.
3. Yasuike M., de Boer J., von Schalburg K.R., Cooper G.A., McKinnel L., Messmer A., So S., Davidson W.S., Koop B.F. Evolution of duplicated IGH loci in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *BMC Genomics*. 11:486.
4. Bengtén E., Quiniou S.M., Stuge T.B., Katagiri T., Miller N.W., Clem L.W., Warr G.W., Wilson M. 2002. The IGH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD. *J Immunol*. 169(5):2488-2497.
5. Danilova N., Bussmann J., Jekosch ., Steiner L.A. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat Immunol*. 6(3):295-302.
6. Hansen J.D., Landis E.D., Phillips R.B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implication for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *PNAS*. V.102-№19:6919-6924.
7. Savan R., Aman A., Sato K., Yamaguchi R., Sakai M. 2005. Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur J Immunol*. 35(11):3320-3331.
8. Ganzha, E.V. Some characteristics of immunity of triploid of the trout *Oncorhynchus mykiss* by their cultivation in condition of South Vietnam. *Matherials of III Symp. "Problems of immunology, pathology and protection of health of fishes"*. Borok: 2011; 90-94.
9. Litman G.W., Frommel D., Chartrand S.L., Finstad L., Good R.A. 1971. Significance of heavy chain mass and antigenic relationship in immunoglobulin evolution. *Immunochem*. V.8:345-348.
10. Андреева А.М. Сывороточные γ -глобулины рыб. *Вопр. ихтиологии*. 2001. Т. 41. №4. С.550-556.

ESTIMATION OF VARIETY AND THE IDENTIFICATION OF IGH OF THE STERLET *ACIPENSER RUTHENUS*

A.E. Dmitrieva, A.M Andreeva

In this work the authors evaluated variety IGH from the serum of sterlet with the aid of MALDI-TOF - analysis. In the fraction of γ_2 - globulins three types of the subunits were revealed, two of which proved to be homologous to each other and to the IGH of candidate proteins with the parameter *score* < 84, which is accepted for determining the reliable homologues. However, the fact of the belonging of candidate proteins with the same family (immunoglobulins, heavy chains) and belonging of the forms of fishes to the same family as sterlet (Acipenseridae) makes it possible to examine IGH of Russian and Siberian sturgeon as the possible homologues of the proteins of sterlet being investigated. This assumption is confirmed by the high level of the parameter of the authenticity (score of higher than 150) of the similarity MS/MS of the spectra of the proteins of sterlet, from one side, and proteins of white sturgeon, Russian and Siberian sturgeon.

СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ, РЫБЕ И ЕЕ ПАРАЗИТАХ В БАССЕЙНАХ РЕК ВЫЧЕГДА И ПЕЧОРА

Доровских Г.Н., Мазур В.В.

ФГБОУ ВПО «Сыктывкарский государственный университет», Сыктывкар, Россия
e-mail: dorovsk@syktsu.ru

Способность рыб и их паразитов накапливать металлы хорошо известна (Барковская, 1997; Urdes et al., 2010). Работы проведены на нескольких видах рыб, половозрелых и личиночных стадиях гельминтов, и других группах инвадентов (Салтыкова, 2006; Baruš et al., 2006). Однако материалы для исследования получены, в основном, из районов подверженных значительному антропогенному воздействию, что не позволяет убедительно судить о закономерностях накопления металлов в теле рыбы и червей. В этом аспекте однозначный интерес представляют исследования, проводимые на сохранных заповедных территориях.

В работе рассмотрено накопление металлов в донных отложениях, рыбе и ее паразитах. Для исследования взяты виды паразитов с разной жизненной стратегией. Одним из них «невыгодна» преждевременная гибель хозяина, поскольку их существование, как любого организма, без среды невозможно, другим гибель хозяина необходима для продолжения своего цикла развития (Гусев, Полянский, 1978).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – гольян *Phoxinus phoxinus* (L.) (тушка), хариус *Thymallus thymallus* (L.) (мышцы, печень), цестоды *Proteocephalus thymalli* (Annenkova-Chlopina, 1923) из кишечника хариуса и плероцеркоиды *Schistocephalus sp.* (длина паразитов 110–112 мм, ширина – 4 мм) из полости тела гольяна (полная длина тела 51–54 мм), донные отложения (ДО).

Материал собран в конце июня – первой декаде июля 2009–2010 гг. из ряда участков р. Б. Шайтановки (правый приток верхнего течения р. Печоры), протекающей по территории Печоро-Ильчского государственного природного заповедника, верхнего и среднего течения р. Печоры (территория Печоро-Ильчского заповедника) и р. Човью (приток р. Вычегды), из участка лежащего в черте г. Сыктывкара. В мае – октябре 2011 г. собран дополнительный материал по содержанию металлов в тканях гольяна из р. Човью.

Учитывая, что содержание металлов в различных органах рыб и беспозвоночных животных зависит от сезона, возраста, пола, размеров, типа питания, физиологического состояния, температуры и pH воды (Pourang et al., 2004), материал в каждый год из всех точек собирали в течение недели. Рыбу для каждой пробы брали одного размера и возраста. Гольян с опухолями помещен в отдельную пробу.

Образцы рыбы и цестод высушивали в полевых условиях и помещали в пробирки без использования консервантов. Далее пробы измельчали до однородной порошкообразной массы. Каждая анализируемая навеска состояла из смеси тканей 10–20 тушек гольяна, 2–3 экз. хариуса, 25 стробил *P. thymalli* или одного плероцеркоида *Schistocephalus sp.* Определение содержания металлов (Ca, Zn, Cu, Mg, Al, Mn, Fe, Cd, Pb, Ti, Tl, Mo, Hg, As, Co, Ni) в пробах

проводили при помощи энергодисперсионной рентгеновской приставки Oxford INCA Energy 250 на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380 LV (Воронежский госуниверситет). При изготовлении пробы сырье озоляли. Донные отложения в пластиковой таре доставляли в лабораторию, где при помощи энергодисперсионного анализатора MESA-500 W и электронного микроскопа JEOL JSM-6380 LV исследовали содержание металлов. В пробах, результаты определения содержания металлов в которых использованы для этой публикации, отмечены только Ca, Zn, Cu, Mg, Fe, Al, Cd, Pb. Концентрации металлов в пробах приведены в мкг/г сухой массы.

Принимая во внимание существование устойчивой корреляции между содержанием металлов в водоеме и в организме рыбы, можно предположить, что отсутствие некоторых из них в организме рыбы и ее паразитах (в рассматриваемом случае Mn, Ti, Tl, Mo, Hg, As, Co, Ni) косвенно свидетельствует об отсутствии или минимальной концентрации последних в окружающей среде. Высокому содержанию металлов в воде, ДО и в организме гидробионтов соответствует адекватное содержание последних в организме рыбы (Ружин, 1990 цит. по: Барковская, 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованных тушках гольяна из бассейна р. Печоры и р. Човью отмечены Ca, Zn, Cu и Mg. У гольяна в бассейне р. Печора из курий Манская и Кременная, из русла р. Печоры в районе устья р. Гаревки обнаружены еще Cd и Pb; в его тушках из русла р. Печора в 2.7 км выше пос. Якша и районе самого поселка – Pb и Al; в тканях гольяна из заостровки р. Печоры в 1.0 км ниже устья р. Б. Шайтановки – Al; в рыбе из р. Човью – Cd и Al.

Металлы в организме половозрелого гольяна из р. Б. Шайтановка и р. Печора в 1.0 км ниже устья предыдущей реки распределились в виде следующего ряда: Ca>>Zn>Cu>Mg. У его молоди из р. Б. Шайтановки (участок на 5.0 км от устья) этот ряд выглядит как Ca>>Cu>Zn>Mg. Такой же ранжированный ряд металлов характерен и для гольяна из курий и района устья р. Гаревки, а также рыб пораженных меланомой. Однако концентрации металлов у перечисленных групп гольяна различны. У гольяна из р. Човью ряд металлов представлен следующим образом: Ca>>Mg>Cu>Zn. Особенно отличается ряд металлов в тушках гольяна из русла среднего течения р. Печора: Cu>Ca>Zn>Mg. Оставшиеся три металла всегда располагаются в конце указанных рядов в следующем порядке: Al>>Pb>Cd.

Наивысшее содержание Ca отмечено в тушках гольяна из р. Човью, самое низкое в рыбе из среднего течения р. Печоры. Самая высокая концентрация Zn характерна для гольяна из среднего течения р. Печоры, самая низкая у рыбы из р. Човью. Более всего Cu содержат тушки гольяна из среднего течения р. Печоры, в остальных точках сбора материала концентрации этого металла в организме рыб примерно одинаковы. Гольян р. Човью отличается высоким содержанием в его тканях Mg, в остальных точках сбора материала концентрации этого металла в организме рыб примерно одинаковы. Самые высокие концентрации Al характерны для тканей рыбы из русла р. Печоры. Алюминий не обнаружен в тушках гольяна из р. Б. Шайтановки и обеих курий. Кадмий отмечен в тушках гольяна из р. Човью, а также обеих курий и русла р. Печора в районе устья р. Гаревки. Свинец найден в тушках гольяна из русла р. Печоры и обеих курий.

Таким образом, выделяются четыре группировки гольяна, отличающиеся по концентрации в их тканях металлов, их ранжированным рядам, отсутствию или наличию в тушках Al, Pb, Cd. Это гольян р. Човью, отличающийся максимальной концентрацией в тканях Ca и Mg, минимальной – Zn, присутствием Al и Cd; рыба из русла среднего течения р. Печоры характеризуется максимальным содержанием в организме Zn и Cu, минимальной – Ca, наличием Al и Pb; гольян из верхнего течения р. Печоры, у которого наряду с Ca, Zn, Cu и Mg, в тканях обнаружены Al, Pb и Cd; рыба из русла р. Б. Шайтановки в теле содержит только Ca, Zn, Cu и Mg.

Менее 5.0% особей гольяна (индекс обилия 0.05–0.1 экз. на одну рыбу) из бассейна р. Печоры поражены плероцеркоидами *Schistocephalus sp.* На наличие металлов в их тканях исследовали червей из р. Б. Шайтановка в 0.2 км от ее устья. В стробилах ремнецов содержание Ca статистически достоверно ($P < 0.001$) ниже, а Zn, Cu и, особенно, Mg выше ($P < 0.001$), чем в тушках гольяна. Ранжированные ряды металлов, зарегистрированных в телах червей, за разные годы не совпадают. В 2009 г. ряд выглядел как Ca >> Cu > Mg > Zn, в 2010 г. – Ca >> Mg > Zn > Cu.

Хариус на содержание в его органах и тканях металлов изучен из р. Б. Шайтановки, где отловлен на 5.0–7.0 км от ее устья. В его мышцах отмечен только Mg. В печени хариуса содержатся Cu, Zn, Mg. Ранжированный ряд этих металлов в оба года проведения работ имеет вид Cu>Zn>Mg.

Все исследованные особи хариуса оказались зараженными половозрелыми *Proteocephalus thymalli* (индекс обилия 14.1 экз. цестод на одну рыбу). В тканях червей зарегистрированы Ca, Cu, Zn, Mg. В стробилах цестод, мышцах и печени хариуса содержание Mg статистически одинаково, тогда как концентрации Zn и Cu в теле червей статистически достоверно ($P < 0.001$) выше, чем в печени рыбы. Ранжированный ряд металлов содержащихся в тканях *P. thymalli* в оба года проведения работ выглядит как Ca>>Cu>Zn>>Mg и совпадает с таковым для металлов из печени рыб.

Итак, в плероцеркоидах *Schistocephalus sp.* концентрация Cu, Zn, Mg достоверно выше, чем в тушках гольяна, тогда как в стробилах *P. thymalli*, по сравнению с печенью хариуса, выше содержание только Zn и Cu. Ранжированные ряды металлов выявленных в телах паразитов и их хозяев в случае системы «хариус – *P. thymalli*» совпадают, в случае системы «гольян – *Schistocephalus sp.*» не совпадают.

Поскольку ведущим фактором, определяющим содержание металлов в гидробионтах, является их концентрация в природных средах – воде и ДО (Брень, 2008), рассмотрим особенности химического состава ДО в местах сбора материала.

Содержание Ca в водах заповедника занимает ведущее место, что объясняется их обогащением известковыми водами, выходящими из-под подножия Пармы. В районе Верхней Печоры широко представлены полиметаллические руды, содержащие Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Pb, Al и др. (Производительные..., 1954). Однако химизм вод Якшинского участка и участка Пармы значительно отличается, например, по количеству Ca почти в 2 раза (Ефимова, Сокол, 1976).

В бассейне среднего течения р. Вычегды, куда относится р. Човью, широко распространены фосфориты и серный колчедан. В составе минералов илистой фракции преобладает бейделлит (Производительные..., 1954), имеющий примеси Mn, Fe, Al, Mg и др.

Указанные геохимические различия участков сбора материала обуславливают разницу по составу металлов ДО. Ранжированный ряд металлов из ДО р. Човью: Mg > Al > Fe >> Ca >> Zn = Cu >> Cd; русла среднего течения р. Печоры: Ca>>Fe≥Cu≥Mg≥Zn≥Al>Pb>Cd; бассейна верхнего течения р. Печоры (курья Кременная: Ca>Fe≥Cu≥Al>Zn≥Mg>Pb≥Cd; устье р. Гаревки: Fe ≥ Cu ≥ Al ≥ Ca > Mg ≥ Zn > Pb ≥ Cd; заостровка в 1.0 км ниже устья р. Б. Шайтановки и курья Манская: Ca >> Al ≥ Fe ≥ Cu > Mg ≥ Zn >> Pb ≥ Cd); русла р. Б. Шайтановки: Ca>>Fe≥Cu≥Mg≥Zn≥Al.

Исследованные ДО по набору металлов и их ранжированным рядам разбиваются на четыре группы: ДО р. Човью, р. Б. Шайтановки, среднего и верхнего (ДО Манской курьи и заостровки р. Печоры в 1.0 км ниже устья р. Б. Шайтановки. К ним близки ДО курьи Кременной и р. Печоры в районе устья р. Гаревки, в иле которых отличен только порядок расположения металлов по концентрации) течения р. Печоры.

Выделено по четыре группы ДО и группировок гольяна, которые совпадают друг с другом.

Ранжированный ряд металлов из ДО, тканей гольяна, хариуса и паразитов района проведения этой работы выглядит как (в скобках металлы перечислены в порядке убывания частоты их встречаемости в рядах):

Ca (Mg, Cu, Fe)>Cu (Al, Mg, Fe, Zn, Ca)>Cu (Fe, Al, Zn, Mg)>Mg (Cu, Al, Ca) и т.д.

На основе опубликованных данных (Барковская, 1997; Салтыкова, 2006; Urdes et al., 2010; и др.) по содержанию металлов в ДО, тканях рыб и их паразитов (*Eubothrium crassus*, *E. rugosum*, *Proteocephalus percae*, *Triaenophorus crassus*, *Ligula intestinalis*, *Eustrongylides sp.*) из других районов построен следующий ряд:

Zn (Fe)>Fe (Zn, Cu, Mn, Pb, Co)>Cu (Mn, Pb, Co, Zn, Ni, Hg)>Mn (Cr, Cu, Pb, Ni, Cd) и т.д.

Эти ряды металлов в 1-й группе имеют одно совпадение, во 2-й – 3, в 3-й – 2, в 4-й – 1 совпадение. Различия указанных рядов статистически достоверны ($\chi^2 = 7.6$; $P < 0.01$).

В большинстве случаев на содержание металлов у рыб анализируют мышцы, но и в этом случае ряды металлов, полученные в ходе этого исследования, не совпадают с опубликованными данными. У хариуса в мышцах отмечен только Mg, у гольяна из р. Човью содержащиеся в мышцах металлы расположились в ряд: Mg>Zn≥Cu>>Cd.

Таким образом, район сбора материала, охватывающий участок бассейна среднего течения р. Вычегды, бассейны верхнего и среднего течений р. Печоры, отличается от других районов по преобладающим в его ДО, рыбе и ее паразитах доминирующим металлам. В ДО здесь наибольшая концентрация отмечена в отношении Ca, Mg, Cu, Fe и Al; в тушках голяна Ca, Zn, Cu и Mg; в печени хариуса Cu, Zn и Mg.

В плероцеркоидах *Schistocephalus sp.* концентрация Cu, Zn, Mg достоверно выше, чем в тушках голяна, тогда как в стробилах *P. thymalli*, по сравнению с печенью хариуса, выше содержание только Zn и Cu. Ранжированные ряды металлов выявленных в телах паразитов и их хозяев в случае системы «хариус – *P. thymalli*» совпадают, в случае системы «голян – *Schistocephalus sp.*» не совпадают. Можно предположить, что плероцеркоиды ремнецов вызывают нарушение механизмов регулирующих баланс металлов в организме голяна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барковская В.В. Паразиты рыб Финского залива как индикаторы экологического состояния его акватории // Сб. науч. Тр. ГосНИОРХ. 1997. Вып. 321. С. 147–153.
2. Брень Н.В. Биологический мониторинг и общие закономерности накопления тяжелых металлов пресноводными донными беспозвоночными // Гидробиол. Журн. 2008. Т. 44. № 2. С. 96–111.
3. Гусев А.В., Полянский Ю.И. Экологическая сущность паразитологии. Вестник ЛГУ. 1978. №3. С. 5–14.
4. Ефимова З.С., Сокол А.П. Связь растительности с химизмом вод на некоторых болотах заповедника // Тр. Печоро-Илычского гос. заповедника. Вып. 13. Сыктывкар: Коми кн. изд-во, 1976. С. 58–65.
5. Производительные сила Коми АССР. Т. 1. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 464 с.
6. Салтыкова С.А. Сравнительный анализ особенностей накопления тяжелых металлов в рыбах и их паразитах (на примере экосистемы Ладожского озера). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Петрозаводский гос. ун-т, 2006. 23 с.
7. Baruš V., Jarkovsky J., Prokeš M. *Philometra ovata* (Nematoda: Philometroidea): a potential sentinel species of heavy metal accumulation, Parasitol. Res., 100, Springer-Verlag, 2006. P. 929–933.
8. Pourang N., Dennis J.H., Ghourchian H. Tissue distribution and redistribution of trace elements in shrimps species with the emphasis on the roles of metallothionein // Ecotoxicology. 2004. V. 13. № 6. P. 519–533.
9. Urdes L.-D., Diaconescu C., Vlase G., Ianitchi D., Diaconescu S., Hangan M. Research on Interrelationship between some Species of Freshwater Fish and Helminthic Larvae within Aquatic Ecosystems Polluted with Heavy Metals // al./Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2010. 43 (2). P. 72–75.

THE CONTENT OF METALS IN THE BOTTOM SEDIMENTS, FISH AND OF IT PARASITES FROM THE VYCHEGDA AND PECHORA RIVER BASINS

Dorovskikh G.N., Mazur V.V.

In given article features of the maintenance of metals (Ca, Fe, Cu, Al, Zn, Mg, Pb, Cd) in bottom sediments, bodies of fish (*Phoxinus phoxinus*, *Thymallus thymallus*) and of it parasites (*Schistocephalus sp.*, *Proteocephalus thymalli*) from the Vycheгда and Pechora river basins.

ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕЧЕНИ МЕРЛАНГА

Дорохова И.И., Кузьминова Н.С.

Институт биологии южных морей, Севастополь, Украина
e-mail: mirenri@bk.ru, kunast@rambler.ru

Мерланг (пикша) является важным промысловым видом северо-западной части Черного моря. Изучение состояния молодежи его популяций представляет несомненный интерес для оценки качества и количества запасов данного вида. Одним из наиболее подходящих органов для биохимических исследований у небольших рыб является печень. Печень – не только

выполняет необходимые для существования организма секреторные функции, но и является одним из главных органов детоксикации.

Для исследования были выбраны следующие показатели печени: активность аминотрансфераз (АЛТ, АСТ, γ -ГГТ), уровень эндогенной интоксикации (ЭИ), активность α -амилазы и концентрация креатинина. Аминотрансферазы играют важную роль в процессах роста и созревания животных. Они участвуют в построении белков и аминокислот (аланина) в печени, где в результате глюконеогенеза из аминокислот синтезируется глюкоза (Самсонова, 2002). γ -ГГТ является маркером состояния печени и желчевыводящих путей и чувствительна к токсическому воздействию. Уровень ЭИ позволяет оценить степень повреждения макромолекул особенно белков, так как основными элементами, вызывающими данное патологическое состояние являются олигопептиды. Определение активности ферментов α -амилазы, γ -ГГТ, а также креатинина у рыб также может быть весьма информативным при изучении воздействия естественных и антропогенных факторов на рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Kandemir, 2010; Rehulka, 2002). Комплекс данных показателей отражает адекватную картину биологического статуса как популяции, так и отдельных особей мерланга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом служил гомогенат печени самок и самцов годовалого мерланга, отловленного в районе Филлофорного поля (Черное море). Активность АЛТ, АСТ, γ -ГГТ, α -амилазы определяли с использованием стандартных наборов реактивов «Филисит», уровень ЭИ оценивался по содержанию олигопептидов, концентрация белка в пробах устанавливалась по методу Лоури (Чиркин, 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Достоверных отличий в активности аминотрансфераз в печени мерланга не установлено. Однако для всех трех ферментов выявлено большее значение изучаемых параметров у самок.

Таблица. Биохимические параметры самок и самцов годовалого мерланга в районе Филлофорного поля

| показатель | самки | самцы |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| АЛТ, мкмоль/час*мг | 0,26±0,07 (n=27) | 0,17±0,05 (n=16) |
| АСТ, мкмоль/час*мг | 0,22±0,06 (n=23) | 0,15±0,03 (n=14) |
| γ -ГГТ мккат/г белка | 0,107±0,032 (n=21) | 0,068±0,015 (n=15) |
| креатинин, мкмоль/г белка | 0,679±0,114* (n=32) | 0,394 ±0,068 (n=18) |
| α -амилаза мг/с/г белка | 7,012±2,57* (n=27) | 2,122±0,623 (n=14) |
| ЭИ, ед.опт.пл.*мл/мг | 0,08±0,017* (n=29) | 0,04±0,011 (n=14) |

Примечание: * - отличия у особей разного пола достоверны

Исследование уровня ЭИ, креатинина и активности α -амилазы в печени разнополых годовалых рыб показало достоверно более высокие значения содержания олигопептидов у самок, нежели для самцов.

Отсутствие выраженных половых отличий активности аминотрансфераз показано и для других рыб – куринского осетра (Yousefian et al., 2011), радужной форели (Yousefian et al., 2010). Известно, что аминотрансферазы играют важную роль в созревании гонад (Самсонова, 2002). Так как все особи находились в состоянии покоя, влияние стадии репродуктивного цикла было исключено.

Необходимо также учитывать возраст исследуемых рыб: годовалые особи мерланга продолжают интенсивно расти и питаться; возможно, что самки и самцы в молодом возрасте обладают разной скоростью роста, и, следовательно, разной скоростью белкового обмена. Характер пищи также может оказывать существенное влияние на активность аминотрансфераз. Половой диморфизм по размеру и массе (у самок эти характеристики выше (Кузьминова и др. 2010) также определяет более высокое содержание креатинина.

Данные об окислении белков, их фрагментации и агрегации у гидробионтов разного пола в литературе практически не встречаются. Однако те, что имеются, указывают на отсутствие отличий данного показателя (Скуратовская, 2009). Проведенные нами ранее исследования

показали наличие половых отличий в уровне ЭИ у ряда черноморских рыб. Так, в крови мерланга, отловленного в прибрежных акваториях г. Севастополя, уровень ЭИ был выше у самцов, хотя отличия были не достоверными (Дорохова, 2010).

Таким образом, достоверные половые отличия установлены для активности α -амилазы, концентрации креатинина и уровня ЭИ, для аминотрансфераз выявлена лишь тенденция превышения показателей у самок по сравнению с самцами. Полученные результаты показывают, что при проведении мониторинга состояния популяций мерланга, необходимо учитывать их половую принадлежность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дорохова И.И. Половые особенности уровня эндогенной интоксикации в крови некоторых черноморских рыб/ Материалы международной научной конференции «Водные биоресурсы и аквакультура: современное состояние и перспективы научного обеспечения», Киев, 12-14 октября 2010 г. с. 285-287.
2. Кузьминова Н.С., Скуратовская Е.Н., Дорохова И.И., Завьялов А.В., Бердиева А.В. Современное состояние черноморского мерланга в прибрежной зоне г. Севастополя // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Том. 1. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. сборник науч. статей – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. С. 108 – 114.
3. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / А.А. Чиркин. Мн.: Новое Знание, 2002. 512 с.
4. Самсонова М.В. Аланин- и аспаратаминотрансферазы как индикаторы физиологического состояния рыб / Дис. ...канд. биол. наук: 03.00.04. Москва, 2002. 166 с.
5. 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.
6. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. С.-П.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
7. Kandemir Ş., Örün İ., Talas Z., Örün G. N., Erdoğan K, Işık M., Altaş L., Duran A. Effects on Mortality of Biochemical and Limnological Properties on Some Fish Species in Sultansuyu Dam Lake (Malatya), Turkey // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2010. 10. P. 431 - 437.
8. Řehulka J. Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry // ACTA VET. BRNO. 2002. 71. P.351 – 360.
9. Yuosefian M., Amiri S., Mojotaba, Kor Davood. Serum Biochemical Parameter of Male, Immature and Female Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) // Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2011. 5 (5): P. 476 - 481.
10. Yuosefian M., Amiri S. Hedayatifard M., Dehpour A.A., Fazli H., Ghiaci M., Farabi S.V., Najafpour S.H. Serum biochemical parameter of male and female rainbow trout cultured in Haraz River, Iran // W.J.Fish Marine Sci. 2010. 2 (6). P. 513 - 518.

GENDER DIFFERENCES OF SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS OF WHITING'S LIVER

Dorohova I.I., Kuz'minova N.S.

Institute of Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Ukraine

Some biochemical parameters of liver of one-year-old male and female whiting caught in the "Fillofornoe pole" area (Black Sea) were studied. The reliable gender specific differences between males and females in activity of α -amylase, creatinine concentration and the level of endogenous intoxication were received. The values of aminotransferases, creatinine, α -amilase, endogenous intoxication in liver of females were higher than males. The results obtained demonstrate that during the monitoring of the populations of whiting, it is necessary to consider their sexual identity.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ ЛАСТОНОГИХ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

И.А.Ерохина

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, Мурманск, Россия
e-mail: erohina@mmbi.info

Ранние этапы развития животных заслуживают особого внимания, поскольку в это время осуществляется наиболее интенсивное формообразование структурно-функциональных систем организма. В связи с этим целью данной работы было исследование метаболизма одного из представителей ластоногих - серого тюленя от рождения до начала самостоятельного питания.

Материал для исследования собран во время экспедиции на Айновы острова (Баренцево море) в 2006г. Животные были разделены на три группы в зависимости от стадии развития, которые в раннем постнатальном периоде жизни определяются характером питания: новорожденные, активно питающиеся молоком матери, закончившие молочное питание. К анализу были привлечены ранее полученные данные о составе крови животных этого вида, прошедших стадию голодания после молочного вскармливания (эта стадия характерна для ластоногих, в отличие от наземных млекопитающих) и приступивших к самостоятельному питанию рыбой. Кровь брали из экстрадуральной вены. В плазме определяли основные показатели обмена белков, липидов, углеводов, минеральных веществ, используя общепринятые лабораторные методы.

Состав крови новорожденных животных отражает адаптации, связанные с рождением, когда прекращается приток питательных веществ с кровью матери. В это время отмечается крайне низкая концентрация глюкозы, к концу периода молочного вскармливания этот показатель снижается более, чем в 3 раза (рис.1), а главным источником энергии служит жир материнского молока. Начало повышения уровня глюкозы в крови тюленей выявлено в возрасте 1.5-2 мес (Ерохина, 2007), а значительный прирост (более, чем в 8 раз) отмечается с началом самостоятельного питания, очевидно, в результате становления механизмов глюконеогенеза, в частности из продуктов катаболизма белков и липидов.

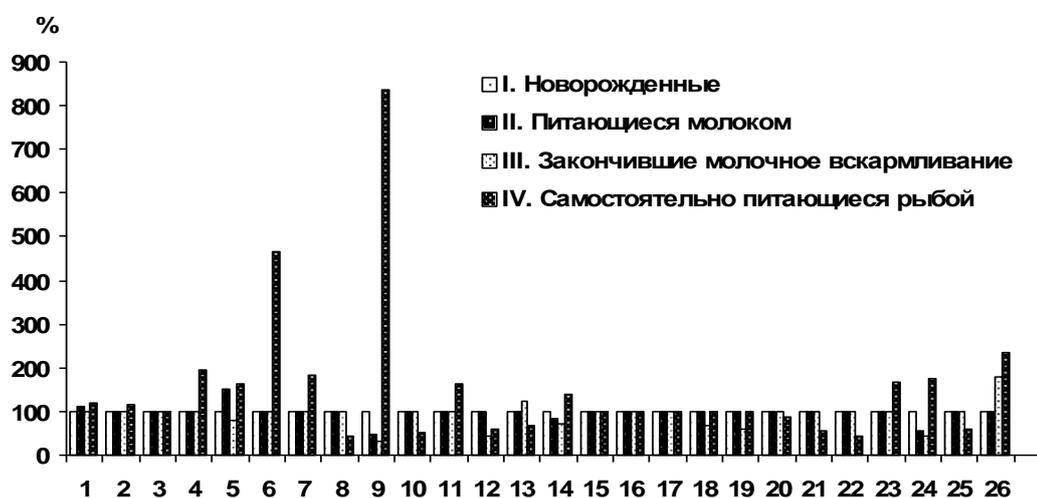


Рис. 1. Изменения показателей обмена веществ в крови серых тюленей в раннем постнатальном периоде развития. Результаты выражены в процентах: для групп II и III по отношению к показателям группы I (100%), для группы IV по отношению к показателям группы III (100%).

Условные обозначения: 1 - общий белок; 2 - альбумин; 3 - α -глобулины; 4 - β -глобулины; 5 - γ -глобулины; 6 - мочевины; 7 - креатинин; 8 - мочевая кислота; 9 - глюкоза; 10 - молочная кислота; 11 - общие липиды; 12 - триглицериды; 13 - общий холестерин; 14 - кальций общий; 15 - фосфор неорганический; 16 - натрий; 17 - калий; 18 - магний; 19 - железо; 20 - хлориды; 21 - лактатдегидрогеназа; 22 - аспаратаминотрансфераза; 23 - аланинаминотрансфераза; 24 - γ -глутамилтрансфераза; 25 - α -амилаза; 26 - щелочная фосфатаза.

К особенностям состава плазмы крови у новорожденных животных относятся также низкая концентрация мочевины, высокая активность γ -глутамилтрансферазы и низкая – щелочной фосфатазы. У большинства морских млекопитающих нормальные значения концентрации мочевины в плазме выше, чем у наземных (Bossart et al., 2001). Такие данные известны для гренландского (Кавцевич, Ерохина, 1996; Voily et al., 2006) и обыкновенного (McConnel, Vaughan, 1983) тюленей, кольчатой нерпы (Geraci, Aubin, 1979). У новорожденных серых тюленей этот показатель составляет всего 3.55 ± 0.94 ммоль/л, что в несколько раз меньше, чем у 1.5-2-месячных щенков. Столь низкое содержание мочевины в крови новорожденных характерно для всех млекопитающих и отражает, как отмечалось выше, адаптации животных, связанные с рождением. Мочевина появляется в крови в значительной концентрации при интенсивном распаде белков. Метаболическая стратегия молодых животных заключается в преобладании процессов синтеза белков в растущем организме, в связи с чем белки не являются в это время поставщиками аминокислот для образования энергетических субстратов. Поскольку материнское молоко тюленей богато липидами (у серых тюленей жир составляет свыше 53% сухого остатка молока) (Amoroso et al., 1950), эти соединения преимущественно вовлекаются в энергообеспечение детенышей, о чем свидетельствует активизация липолиза.

γ -Глутамилтрансфераза (ГТФ) - фермент, ассоциированный с клеточными мембранами многих органов (печень, сердце, мышцы, почки). Есть сведения о том, что ГТФ может использоваться в качестве маркера пассивного переноса иммуноглобулинов у новорожденных морских зверей, поскольку молозиво и молоко лактирующих самок характеризуются высокой активностью ГТФ (Bossart et al., 2001). Аналогичные данные есть и для наземных домашних млекопитающих (Meyer, Harvey, 1998). Однако, значения активности ГТФ для этих животных более, чем в 10 раз превышают таковые для новорожденных серых тюленей в нашем исследовании, а также показатели щенков гренландского тюленя и тюленя-хохлача (Voily et al., 2006). Отсюда следует, что формирование пассивного иммунитета за счет иммуноглобулинов матери у лаастоногих происходит с меньшей интенсивностью по сравнению с наземными млекопитающими.

Щелочная фосфатаза (ЩФ), обнаруживаемая в плазме крови взрослых животных, имеет печеночное происхождение, а на ранних стадиях онтогенеза присутствует значительное количество костной фракции фермента. У морских млекопитающих по сравнению с наземными активность ЩФ выше во все возрастные периоды (Bossart et al., 2001; Voily et al., 2006). Есть данные о том, что уровень ЩФ в плазме крови морских млекопитающих коррелирует с интенсивностью анаболических процессов в организме и концентрация фермента может использоваться в качестве показателя упитанности животных, а также дифференциации катаболических и анаболических состояний (Dover et al., 1993). У новорожденных тюленей активность ЩФ низкая, и достоверно увеличивается только к концу периода молочного вскармливания, отражая, очевидно, интенсивный рост костной ткани. Во время активного питания в составе крови происходят незначительные изменения: увеличивается концентрация общего белка, уменьшается содержание глюкозы и кальция, снижается активность γ -глутамилтрансферазы.

К концу молочного вскармливания состав крови меняется значительно – по сравнению и с новорожденными, и с питающимися молоком животными. Так, происходит уменьшение содержания белка, на фоне этого достоверно повышается уровень альбумина и уменьшается содержание бета- и гамма-глобулинов. Последнее заслуживает особого внимания, учитывая роль белков этой группы в функционировании системы иммунитета. Очевидно, синтез собственных иммуноглобулинов, составляющих основную часть фракции гамма-глобулинов, у животных этого возраста еще не происходит, а начинается с переходом к самостоятельному питанию, так как антигены пищи стимулируют процесс. Кроме этого, повышается уровень конечного продукта обмена белков – мочевины, что свидетельствует об усилении катаболизма белков. К концу молочного вскармливания в плазме крови тюленей продолжает снижаться активность γ -глутамилтрансферазы, но увеличивается активность щелочной фосфатазы.

Наиболее существенные изменения в составе крови тюленей отмечаются с началом самостоятельного питания. Концентрация глюкозы достигает нормального для взрослых животных уровня. Повышается содержание общего белка за счет трех фракций – альбумина,

бета- и гамма-глобулинов, причем содержание последней практически такое же, как и в начале питания материнским молоком, когда эта фракция формируется за счет материнских иммуноглобулинов. Уменьшается концентрация лактата, отражая преобладание аэробных механизмов утилизации глюкозы как энергетического субстрата. И, наконец, изменяется активность всех изученных ферментов.

Таким образом, в раннем периоде постнатального развития серых тюленей происходят метаболические перестройки, присущие млекопитающим в целом, однако степень выраженности отдельных реакций может рассматриваться как особенность ластоногих. Наиболее значительные изменения в метаболизме тюленей происходят в период окончания молочного вскармливания и перехода к самостоятельному питанию, как отмечалось нами ранее (Ерохина, 2007) и для других видов ластоногих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерохина И.А. Биохимические показатели плазмы крови гренландского тюленя *Pagophilus groenlandicus* Erxleben, 1777 (Pinnipedia, Phocidae) разного возраста // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2007. Т.43, № 3. С.254-257.
2. Кавцевич Н.Н., Ерохина И.А. Биохимические и цитологические исследования морских млекопитающих в Арктике. Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 1996. 169с.
3. Amoroso E.C., Goffin A., Halley G., Harrison M.L. Matthews D.J. Lactation in the grey seal // J.Physiol. 1950. N 4. P.113.
4. Boily F., Beaudoin S., Measures L. Hematology and serum chemistry of harp (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) during the breeding season, in the Gulf of St.Lawrence, Canada // J.Wildlife Diseases. 2006. V.42, N 1. P.115-132.
5. Bossart G.D., Reidarson T.H., Dierauf L.A., Duffield D.A. Clinical pathology // Handbook of marine mammal medicine. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2001. P.383-436.
6. Dover S.D., McBain D.V.M., Little K. Serum alkaline phosphatase as an indicator of nutritional status in cetaceans // Proc. Int. Assoc. Aquatic Animal Medicine. 1993. N 24. P.44.
7. Geraci J.R., Aubin D.J.St. Influence of age, condition, sampling time, and method on plasma chemical constituents in free-ranging ringed seals, *Phoca hispida* // J. Fish. Res. Board Can. 1979. V.36.- P.1278-1282.
8. McConnel L.C., Vaughan R.W. Some blood values in captive and freeliving common seals (*Phoca vitulina*) // Aquat.Mamm. -983. V.10, N 1. P.9-13.
9. Meyer D.J., Harvey J.W. Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. W.B.Saunders, Philadelphia, 1998. P.157-186.

METABOLISM PECULIARITIES OF PINNIPEDS IN EARLY POSTNATAL PERIOD OF DEVELOPMENT

I.A.Yerokhina

Murmansk Marine Biological Institute KSC RAS, Murmansk, Russia

The results of research of some biochemical parameters of seal's blood in the period from birth to the beginning of independent feeding are presented. Blood plasma was tested for the main parameters of protein, lipid, carbohydrate, and mineral metabolism (total protein, albumin, α -, β -, γ -globulins, urea, creatinine, uric acid, glucose, lactic acid, total lipids, calcium, inorganic phosphorus, sodium, potassium, magnesium, iron, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, γ -glutamyltransferase, α -amylase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase). It is established, that the early postnatal development of seals is accompanied by metabolic rearrangements characteristic of mammals in general; however, the degree of expression of certain reactions can be regarded as a characteristic feature of pinnipeds. The most significant changes in the metabolism of seals are noted at the end of milk feeding and the transition to independent feeding.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕННОЙ ФЕНОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЛИНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РЫБ РОДА *COREGONUS*

Е.В. Ефремова, Л. С. Пашина

Тюменский государственный университет, Лаборатория качества вод, устойчивости
водных экосистем и экотоксикологии, Тюмень, Россия
email: katerinaef@yandex.ru

В условиях возрастающих антропогенных нагрузок на гидроэкосистемы наиболее уязвимыми оказываются ранние стадии развития рыб с еще не сформировавшимися механизмами токсикорезистентности. Среди представителей высшего трофического уровня пресноводных экосистем сиговые рыбы являются наименее устойчивыми к интоксикации. Под воздействием различных поллютантов у них наблюдаются патоморфологические изменения в репродуктивной системе (Таликина и др., 1999, Таликина и др., 2001). К числу наиболее распространенных поллютантов относятся фенолы, в связи с чем возникает необходимость исследования воздействия веществ данного ряда на формирование репродуктивной системы сиговых рыб. Нередко в природных водоемах под влиянием антропогенной деятельности временно появляются токсиканты, но через некоторое время условия обитания могут возвращаться к природным показателям. Однако в период воздействия токсиканта могут произойти нарушения развития отложенной икры, – а его последствия проявятся в отклонении развития личинок в постэмбриональный период, спустя несколько недель или месяцев после его влияния.

Цель работы – оценить влияние временной фенольной интоксикации на морфофункциональные характеристики и цитоморфологические особенности первичных половых клеток (ППК) у зародышей сига и его гибрида с рипусом.

Ее реализация сводилась к решению следующих задач:

1. Охарактеризовать морфодинамику эмбрионов сига и гибрида сиг × рипус в период органогенеза после месячной экспозиции в растворе фенола разных концентраций и последующего пребывания в чистой среде.
2. Проанализировать динамику количества ППК в ходе эмбрионального развития исследуемых видов рыб и её изменение в опытных группах.
3. Проследить динамику цитоморфологических состояний ППК в ходе эмбрионального развития исследуемых видов рыб и её изменение в группах, подвергшихся временной фенольной интоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оплодотворенная икра сига *Coregonus lavaretus maraenoides* и его гибрида с рипусом *Coregonus albula* infrsp. *ladogensis* (далее — гибридная форма) в ноябре 2010 г. была доставлена из Челябинской области (Аргазинское водохранилище) и помещена в инкубационные аппараты автоматизированной установки замкнутого водоснабжения. Спустя 30 суток, на этапе органогенеза, зародыши сига и гибридной формы (по 30 экз. в 3 повторностях на каждый вариант и контрольную партию) были помещены в чашки Петри с периодически сменяемой средой. Растворы фенола были представлены в двух концентрациях: 0.005 мг/л (1 вариант) и 0.015 мг/л (2 вариант). Чистая вода в контроле и растворы в эксперименте менялись каждые 3 суток. После 30-суточной экспозиции, через 61 сутки после оплодотворения, зародыши вновь были переведены в чистую воду, а на 154 сутки эксперимент завершили.

С использованием бинокля МБС-10 (56×) описывали морфологические особенности всех развивающихся зародышей и фиксировали в смеси Буэна для гистологического анализа. Гистологические препараты готовили по стандартной методике (Ромейс, 1953). Препараты анализировали на микроскопе AxioImager A1 («Zeiss») при увеличениях 200×, 400× и 1000× с использованием ПО AxioVision 4.7.1. («Zeiss»).

В ходе эксперимента было проанализировано 1530 ППК у 34 эмбрионов сига и 32 эмбрионов гибридной формы. Измеряли и фотографировали с помощью видеокамеры AxioCam MRc5 («Zeiss»). Для статобработки использовали пакет MS Excel (2005), STATISTICA 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зародышевое развитие сига и его гибридной формы в начальный период инкубации (в течение 7 суток) проходило при температуре воды +4...+6°C. В дальнейшем она понижалась до +1.0...+0.2°C и оставалась на этом уровне до завершения эксперимента.

Морфодинамика зародышей сига и гибридной формы в условиях фенольной интоксикации.

В ходе эксперимента внимание уделялось морфологическим характеристикам исследуемых эмбрионов сига и гибридной формы. Так, при первом наблюдении зародышей на 61 сутки после оплодотворения как у сига, так и у гибридной формы в обоих опытных вариантах отмечались нарушения пигментации глаз, кровь также была бесцветна. Кроме того, во 2 варианте зародыши были неподвижны, их позвоночник в хвостовом отделе искривлен. Опытные эмбрионы имели небольшие размеры и слабо развитые органы. К концу эксперимента (154 сутки после оплодотворения) контрольные зародыши активно работают грудными плавниками, у них хорошо развита кровеносная система и сосудистая сеть желточного мешка, тело и голова пигментированы, то во втором варианте кровь эмбрионов сига и гибрида остается бесцветной, пигментация глаз нарушена, причем нарушения сильнее выражены у гибридной формы – наблюдается разрушения меланинового пигмента. В первом варианте во всех случаях наблюдались промежуточные признаки.

Смертность зародышей во время пребывания в растворах, содержащих токсикант, в обоих вариантах оставалась незначительной и возрастала к концу эксперимента. Однако воздействие токсиканта приводит к необратимым изменениям, даже после 2-х месячного пребывания в чистой воде отставания и нарушения в развитии не компенсируются и со временем наступает летальный исход.

Первичные половые клетки у сига и гибридной формы при фенольной интоксикации.

Сиг. В начале органогенеза ППК отличаются повышенной пролиферативной активностью (37,9%), выражающаяся в наличии полиморфных клеток и кластерных образований, процент которых в норме к 128 суткам снижается до 7,4%, а численность клеток с типичным строением увеличивается. Такой эффект наблюдается и в экспериментальных группах, однако процент нетипичных ППК намного выше и в общей массе они доминируют. Это говорит о более интенсивно протекающих пролиферативных процессах. Митозы редки и обнаружены на 61-е сутки только у экспериментальных эмбрионов.

Не смотря на высокую пролиферативную активность, на начальных этапах органогенеза и до 94 суток среднее количество первичных гоноцитов у сига в контроле и опытных вариантах колеблется в среднем от 17 до 21. Однако к 128 суткам количество ППК в Варианте 1 повышается и достоверно превышает численность контроля почти в 2 раза (табл. 1). Эмбрионы из варианта 2 к 128 суткам все погибли.

Возможно, достаточно малое количество ППК, не смотря на высокую пролиферативную активность, связано с большой долей клеток с нарушениями ядрышкового аппарата.

Стоит отметить, что на начальном этапе ППК с атипичным строением ядрышкового аппарата присутствует во всех вариантах, однако в контроле он находится изначально на низком уровне и к концу эмбриогенеза (128 суток) таких клеток не обнаружено, а в опытных вариантах их доля находится на высоком уровне в течение всего эмбриогенеза (табл. 1).

Таблица 1 Количество ППК у эмбрионов сига в разных вариантах эксперимента

| Вид | Вариант | Количество ППК в 1 эмбрионе | | |
|-----|-----------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | 61 сутки | 94 суток | 128 суток |
| Сиг | Контроль | 21.4 ± 3.2 5–38 (3.8%)* | 21.8 ± 6.5 8–46 (14.6%)* | 27.4 ± 2.9 19–34 (26%)* |
| | Вариант 1 | 17.3 ± 0.5 16–18 (0.9%)* | 16.4 ± 4.8 5–33 (15.6%)* | 55.8 ± 5.9 43–71 (25.5%)* |
| | Вариант 2 | 19.8 ± 4.9 12–34 | 19.0 ± 3.9 12–34 (11.5%)* | – |

*Доля (%) числа ППК с морфологическими изменениями ядрышек от общего числа клеток.

Гибридная форма. Как и в случае с сигом, на начальных этапах органогенеза гибридной формы среди общей массы клеток наблюдаются кластерные образования и полиморфные клетки. Однако в контроле их меньше, чем у сига, что говорит о более раннем завершении пика пролиферативной активности. Как и положено, к концу эмбриогенеза, численность типичных клеток повышается, и к 128 суткам составляет все 100 % (у сига 92%). Под действием токсиканта наблюдается, как и у сига, повышение пролиферативной активности, которая проявляется в высокой доле полиморфноядерных клеток и синцитиальных образований и даже наличием митозов в том и другом варианте.

Но, не смотря на сходную картину пролиферативной активности, динамика количества ППК у гибридной формы имеет несколько иную картину. И можно отметить следующие особенности. Так, у особой контрольной группы происходит сначала незначительное повышение численности первичных гоноцитов, а к завершению эмбрионального развития она резко падает до очень малых значений (4,5). Динамика количества ППК в варианте 1 такая же, как и у сига этого же варианта, т.е. примерно одинаковое количество клеток в начале эксперимента и резкое увеличение их числа после 2-х месячного пребывания в чистой воде (128 суток). Количество клеток во 2 варианте возрастает к 94 суткам (после месяца проведенном в чистой воде) и резко снижается к 128 суткам после 2-х месяцев проведенных в чистой воде (Табл. 2).

Таблица 2. Количество ППК у эмбрионов гибридной формы в разных вариантах эксперимента

| Вид | Вариант | Количество ППК в 1 эмбрионе | | |
|-----------------|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | 61 сутки | 94 суток | 128 суток |
| Гибридная форма | Контроль | 19.5 ± 6.4 1–46 (1.5%)* | 21.8 ± 8.1 3–48 (0.6%)* | 4.5 ± 1.2 2–7 (3.6%)* |
| | Вариант 1 | 12.6 ± 0.9 10–15 (19.3%)* | 8.3 ± 2.2 4–21 (21.4%)* | 28.0 ± 4.3 43–71 (16.5%)* |
| | Вариант 2 | 7.0 ± 5.5 1–18 (20.4%)* | 14.0 ± 2.0 12–16 (31.3%)* | 25.4 ± 3.4 10–40 (29.6%)* |

*Доля (%) числа ППК с морфологическими изменениями ядрышек от общего числа клеток.

Возможно, это связано с высокой долей клеток с нарушением ядрышкового аппарата еще в большей степени проявляющейся у гибридной формы, чем у сига.

Известно, что ранние стадии развития наиболее чувствительны к воздействию различных факторов (Данильченко, 1977; Bourraehot S. et al, 2008). Чем раньше эмбрионы начинают испытывать воздействие токсиканта, тем более глубокие изменения отмечаются у предличинок. Особенно чувствительной оказывается половая система. И как результат, воспроизводительный потенциал рыб сильно снижается: замедляется темп развития, сроки созревания изменяются, увеличивается процент неоплодотворенных яйцеклеток во время нереста, повышается гибель на ранних этапах онтогенеза, снижается резистентность к неблагоприятным факторам среды.

Последующее развитие эмбрионов сига и гибридной формы в чистой воде не компенсирует патологические изменения, что говорит о пролонгированном действии, вследствие кумулятивного эффекта токсиканта.

Нарушения ППК характеризуются патологическими изменениями ядрышкового аппарата и в большей степени проявляются у гибридной формы. Даже незначительные патологические отклонения в структуре ядрышек влекут за собой серьезные последствия. Эти клетки обречены на гибель (Зацепина, 2007).

ВЫВОДЫ:

1. После месячного пребывания зародышей сига и гибрида сиг × рипус на этапе органогенеза в растворах фенола (0.005 мг/л и 0.015 мг/л) последующее их развитие в чистой воде не компенсировало патологические изменения развития.

2. У сига и гибридной формы отмечается высокая пролиферативная активность, проявляющаяся в полиморфноядерности и наличии клеток в синцитиальных структурах, но в большей степени выраженная у опытных эмбрионов сразу после действия фенола.
3. Динамика количества ППК у сига и гибридной формы видоспецифична. У сига к концу эмбриогенеза наблюдается увеличение числа первичных гоноцитов, у гибридной формы наоборот.
4. Воздействие фенола вызывает нарушения ядрышкового аппарата, в большей степени проявляющиеся у гибридной формы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Данильченко О.П. Чувствительность эмбрионов рыб к действию токсических веществ // Вопр. ихтиологии. 1977. Т. 17. Вып. 3. С. 518-527.
2. Зацепина О.В. Современные представления о свойствах и функциях ядрышка: ядрышко как мишень стрессовых воздействий на клетки // Цитология. 2007. Т.49. №9. С.748-749.
3. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Ин.лит., 1953. 718с.
4. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н., Папченкова Г.А. Влияние токсических веществ в период эмбриогенеза на выживаемость, линейно-весовые показатели и формирование гонад сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* // Вопр. ихтиологии. 1999. Т. 39. № 3. С. 401-409.
5. Таликина М.Г., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю.В. Аберрантные митозы и гистопатология гонад у сеголеток плотвы *Rutilus rutilus* после токсических воздействий в эмбриональный и личиночный периоды развития // Вопр. ихтиологии. 2001. Т. 41. № 2. С. 232-238.
6. Bourraehot S., Simon O., Gilbin R. The effect of waterborne uranium on the hatching success, development and survival of early life stage of Zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology. 2008. Vol. 90. P.29-36.

TEMPORARY INFLUENCE OF PHENOL ON THE FORMATION OF GERM LINE IN DURING THE EMBRYONIC PERIOD OF WHITEFISH (CORIGONIDAE)

E.V. Efremova, L.S. Pashina

Studies of primordial germ cells (PGCs) cytomorphology were conducted in embryos of Lake Chud whitefish and Lake Chud whitefish × Lake Ladoga cisco hybrid immediately after being exposed to phenol solution at concentrations 0.005 mg/L and 0.015 mg/L for one month, as well as after their transfer into pure water. They demonstrated that phenol intoxication resulted in the delayed development of embryos, in pathophysiological and morphological abnormalities, and in defects of the nucleolar apparatus in PGCs. After the embryos were transferred in pure water, the increase in PGC nucleolar structure abnormalities was not compensated but only delayed; the detected impairments were species-specific and dose-dependent.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ КАРПОВЫХ РЫБ К ТРЕМАТОДОЗАМ

О.Н. Жигилева

Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия
e-mail: zhigileva@mail.ru

Трематоды играют ведущую роль в гельминтофауне многих пресноводных рыб. Личинки трематод преобладают по обилию, частоте встречаемости и видовому разнообразию среди гельминтов рыб семейства Карповых. Некоторые из этих видов трематод имеют важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение, являясь патогенными для самих рыб, или последние служат источником заражения для питающихся ими домашних, диких животных и человека. Наиболее массовыми и широко распространенными на территории Западной Сибири являются трематоды семейств *Diplostomatidae*, *Strigeidae* и *Opisthorchidae*. Последние относятся к числу социально значимых, поскольку являются возбудителями описторхоза человека и животных.

В основе устойчивости и восприимчивости рыб к гельминтозам лежат биохимические, иммунологические и генетические механизмы, определяющие специфичность паразита к хозяину

и различия в уровнях инвазированности разных локальных популяций. Цель данной работы – поиск генетических и биохимических маркеров устойчивости карповых рыб к трематодозам.

Материалом для исследования послужили 3 вида рыб: язь *Leuciscus idus* Linnaeus, 1758, плотва *Rutilus rutilus lacustris* Pallas, 1811 и елец *Leuciscus leuciscus baikalensis* Dybowski, 1874 (Cypriniformes: Cyprinidae), отловленных в 6 реках Обь-Иртышского бассейна: Северная Сосьва, Обь, Большой Салым, Иртыш, Конда и Тобол. Забор материала производился в ходе контрольных отловов, осуществляемых на базе филиалов ГУ «Нижнеобьрыбводхоз» в ноябре-январе 2008-2009 гг. Всего изучено 11 выборок язя (272 особи), 10 выборок сибирской плотвы (278 особей) и 4 выборки ельца (70 особей). Гельминтологические исследования осуществляли с использованием микроскопа Axiostar Plus по стандартной методике (Быховская-Павловская, 1985). Для подсчета личинок описторхид использовали компрессионный метод в модификации В.В. Звягиной (1995). Для видовой диагностики трематод использовали определители (Определитель..., 1987; Метацеркарии..., 2002). Рассчитывали индекс обилия – среднее количество личинок паразита на одну рыбу, для описторхид – на 1 см² поверхности спинных мышц.

В качестве генетических маркеров были выбраны выявляемые методом ПЦР последовательности ДНК, фланкированные простыми повторами (ISSR – inter simple sequence repeat), которые являются разновидностью RAPD и относятся к категории мультилокусных маркеров ДНК. Они отражают изменчивость генома в целом, включая кодирующую и некодирующую его части, в том числе регуляторные последовательности (Williams et al., 1990; Zietjiewicz et al., 1994). Поскольку неспецифическая резистентность организма, включающая и устойчивость к паразитарной инвазии, носит полигенный характер, применение мультилокусных маркеров может быть весьма перспективным при поиске ассоциативной связи между генотипами и зараженностью паразитами (Жигилева, 2010). В качестве биохимических маркеров использовали аллозимы и изоформы миогенов – растворимых белков мышечной ткани. Белки скелетных мышц экстрагировали стандартным способом с использованием трис-НСI буфера (рН 8.0). Для разделения белков использовали метод вертикального электрофореза в 7,5 % полиакриламидном геле. Всего изучено 18 локусов, кодирующих 6 белковых систем (ЛДГ, МДГ, ААТ, СОД, неспецифические эстеразы и миогены). ДНК экстрагировали из сердечной мышечной ткани, фиксированной в 70 % этаноле методом щелочного лизиса. Амплификацию последовательностей, ограниченных простыми повторами, проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР буфер (0.01 М трис-НСI, 0.05 М КСI, 0.1 % тритон X-100), 4 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTPs, 1 мкл раствора тотальной ДНК, 2.5 мМ праймера и 0.2 ед/мкл *Tag*-полимеразы («Fermentas») на амплификаторе Chromo-4 («Bio-Rad») в следующем режиме: 94°C – 7 мин, затем 94°C – 30 с, 52(56)°C – 45 с, 72 °C – 2 мин (40 циклов), 72 °C – 7 мин. Для ISSR-PCR анализа использовали 3 праймера: (AG)₈G (№2), (AG)₈T (№3) и (CA)₈G (№4). Анализ ISSR-PCR-фрагментов осуществляли в 2% агарозном геле. Длины фрагментов определяли с помощью маркера молекулярных масс ДНК 100bp («Fermentas»). Гели документировали с помощью системы VersaDoc (Bio-Rad). По электрофореграммам составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось «1» и рассматривалось как доминантный аллель, отсутствие – «0» и рассматривалось как рецессивный аллель. Методами статистических сравнений по критерию Стьюдента и дисперсионного анализа (ANOVA) по критерию Фишера сравнивали количество трех наиболее массовых видов паразитов и суммарного количество личинок трематод у рыб с разными ISSR-PCR-бэндами и генотипами локусов изоферментов. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Excel, STATISTICA 6.0.

В мышцах и внутренних органах язя, плотвы и ельца были выявлены личинки 7 видов трематод: *Opisthorchis felineus*, *Metorchis bilis*, *Ichthyocotylurus* sp., *Paracoenogonimus ovatus*, *Rhytidocotyle campanula*, *Cotylurus platycephalus*, *Metorchis xanthosomus*, из них первые три вида были наиболее массовыми. Язь инвазирован личинками описторхисов на 96-100% с показателями обилия от 3 до 15 личинок на 1 см² поверхности спинных мышц. Меторхисы встречаются у 63-100% язев в количестве 1-3 личинок на 1 см². Метацеркарии ихтиокотилурусов встречаются во внутренних органах язев, преимущественно на сердце, с частотой 9-54%. Зараженность плотвы описторхисами на порядок ниже, чем язя, а ихтиокотилурусами – выше. Елец имеет показатели экстенсивности инвазии, сопоставимые с таковыми язя, хотя обилие личинок в его тканях меньше (Жигилева и др., 2010б).

Генетическая изменчивость по изоферментам плотвы, язя и ельца из рек Обь-Иртышского бассейна описана нами ранее (Жигилева и др., 2010a). В результате сравнительного паразитологического анализа носителей разных генотипов по локусам изоферментов выявлено, что у язей, обладателей генотипа АВ по локусу неспецифических эстераз *EST-2** достоверно больше обилие *O. felineus* и суммарное количество метацеркарий по сравнению с генотипами АА, ВВ и ВС ($P < 0,05$). По локусу *EST-3** у носителей гетерозиготного генотипа АВ достоверно больше обилие описторхисов, ихтиокотилурусов и общая зараженность метацеркариями всех видов трематод по сравнению с обладателями генотипа ВВ, ихтиокотилурусами – по сравнению с язями - обладателями генотипа АА ($P < 0,05$). По локусу *MDH-2** язи с генотипом АВ достоверно больше были заражены личинками описторхисов и всеми видами трематод, чем носители генотипа АС ($P < 0,01$). По локусу *SOD-1** у гетерозигот АВ и гомозигот ВВ достоверно больше, чем у АА метацеркарий описторхисов, меторхисов и общее количество трематод ($P < 0,05$). По локусу *MDH-1** достоверных различий по зараженности обладателей разных генотипов не найдено.

У плотвы зависимость количества трематод в тканях от генотипов была достоверной по четырем из семи изоферментных локусов. По локусу *EST-2** обладатели генотипа АД были достоверно сильнее инвазированы описторхидами ($P < 0,05$), чем обладатели всех остальных генотипов. Такая же зависимость была установлена и у язя и может быть закономерной – генотипы локуса *EST-2** могут служить маркерами устойчивости к описторхозной инвазии. По локусам *MDH-1** и *SOD-1** различия в инвазированности трематодами обладателей разных генотипов были не достоверны, в отличие от язя, у которого по локусу *SOD-1** выявлены достоверные различия. По локусу *SOD-2** у особой плотвы, гомозиготных по быстрому аллелю было больше ($P < 0,05$) метацеркарий ихтиокотилурусов. По локусу *MY-5** такая же ситуация наблюдалась у носителей аллеля В – гомозигот ВВ и гетерозигот ВС. По локусу *MY-6** более заражены личинками трематод ихтиокотилурусов были обладатели генотипа АА. По локусу *MY-1** зависимость инвазированности от генотипа не выявлена, а остальные локусы миогенов у плотвы мономорфны.

У ельца различия в инвазированности обладателей разных генотипов были не достоверны по всем проанализированным локусам и всем видам трематод, что может быть обусловлено меньшим объемом выборки по сравнению с язем и плотвой.

Связь параметров биохимического полиморфизма в популяциях животных с какими-либо признаками может быть обусловлена дифференциальной смертностью особей, различающихся генотипами белковых локусов, и неслучайным по отношению к генотипам перераспределением особей в пространстве, а также результатом селективности выборок (Бойко, 1997).

Также выявлена дифференциальная зараженность метацеркариями трематод двух видов карповых рыб (язя и плотвы) с разными ISSR-бэндами. У плотвы из 13 бэндов, синтезированных с использованием праймера № 3, 11 были полиморфны. Из них достоверные различия в зараженности личинками трематод носителей разных аллелей выявлены только по одному – по 4-ому бэнду у обладателей доминантного аллеля («1») было в 5 раз больше личинок *M. bilis*, чем у обладателей рецессивного, 0-аллеля ($F = 0,046$, $P < 0,05$). У язя было проанализировано 20 бэндов, синтезированных с использованием трех праймеров. 12 из них были полиморфны, и по 6 из них установлены достоверные различия в инвазированности носителей разных аллелей. Все полиморфные бэнды, идентифицированные с использованием праймера № 2, оказались ассоциированы с обилием метацеркарий *O. felineus* в мышцах язей. Количество личинок было больше у обладателей доминантного аллеля «1» по локусу p2-2 и у обладателей рецессивного 0-аллеля по локусам p2-4, p2-6 и p2-7 ($P < 0,05$). Суммарное количество трематод определяется количеством личинок описторхисов (по данным корреляционного анализа) и показывает такую же закономерность. Бэнды, синтезированные с использованием праймера № 4, не ассоциированы с трематодозной инвазией язя, а полученные с помощью праймера № 3 – ассоциированы с инвазией. У обладателей доминантного аллеля по локусу p3-7 было достоверно меньше метацеркарий *O. felineus* ($P < 0,05$). У обладателей 0-аллеля локуса p3-2 было достоверно больше личинок *M. bilis* и *Ichthyocotylurus sp.* ($P < 0,05$), чем у обладателей альтернативного аллеля «1». Интересно, что у плотвы бэнды, полученные с использованием 3-го праймера также были ассоциированы с инвазией *M. bilis*. Это может указывать на сходство генетических механизмов устойчивости разных видов карповых рыб к трематодозной инвазии.

Таким образом, выявлена ассоциация биохимических и генетических маркеров с предрасположенностью плотвы и язя к инвазии трематодами. Некоторые аллели ISSR-локусов (p3-4 у плотвы и p2-4, p2-7 и p3-7 у язя) и генотипы изоферментных локусов могут служить маркерами предрасположенности к инвазии описторхидами. Эти маркеры могут быть использованы для прогнозирования изменения напряженности паразитологической ситуации по актуальным трематодозам при изменении состава и структуры популяций рыб.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (госконтракт № П1712).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. – Л.: Наука, 1985. 108 с.
2. Бойко Е.Г. Влияние селекционно-генетических и экологических факторов на структуру популяций карповых рыб. Дисс... канд. биол. наук. Тюмень, 1997. 135 с.
3. Жигилева О.Н., Ожирельев В.В., Броть И.С., Пожидаев В.В. Популяционная структура трех видов рыб (Cypriniformes: Cyprinidae), обитающих в реках Обь-Иртышского бассейна, по данным изоферментного анализа // Вопросы ихтиологии, 2010а. Т. 50, № 6. С. 811–820.
4. Жигилева О.Н., Зеновкина Д.В., Ожирельев В.В. Зараженность метацеркариями трематод рыб семейства Карповых из рек Обь-Иртышского бассейна // Вестник Мордовского университета. Серия "Биологич. науки", 2010б. № 1. С. 170-174.
5. Жигилева О.Н. ПЦР-маркеры предрасположенности карповых рыб к трематодной инвазии // Вестник ТюмГУ, 2010. № 7. С. 82–87.
6. Звягина В.В. Структурно-функциональные особенности метацеркарий *Opisthorchis felineus*; оптимизация способов обеззараживания и контроля рыбы, инвазированной личинками возбудителя описторхоза. Автореф. дисс.... канд. биол. наук. Тюмень, 1995. 16 с.
7. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России: / В.Е. Судариков и [др.] // Отв. ред. В.И. Фрезе. М.: Наука, 2002. 185 с.
8. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные. Ч.2. Л.: Наука, 1987. 583 с.
9. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res., 1990. V. 18. P. 6531–6535.
10. Zietjiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics, 1994. V. 20. P. 176–183.

BIOCHEMICAL AND GENETIC MARKERS FOR RESISTANCE TO TREMATODE INFECTION IN CYPRINID FISH

O.N. Zhigileva

Tyumen State University, Tyumen, Russia

Allozyme and ISSR-PCR markers associated with groups of cyprinid fish, which have increased susceptibility to trematode infestation were identified. Heterozygotes of isozyme loci strongly infected with trematode larvae than homozygotes. Dominant alleles of loci p2-4, p2 and p3-7 in the ide and the recessive allele of locus p3-4 in roach can be used as markers of resistance to the trematode infestation in these fish species.

АДАПТАЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ДВУХЛЕТОК КАРПА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАУНДАПА И ПРОБИОТИКА

Жиденко А.А., Барбухо Е.В., Кривопиша В.В.

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,

Чернигов, Украина

E-mail: chgri@chgri.cn.ua; zaa2006@ukr.net

В оценке физиолого-биохимического состояния рыб и возможности адаптации в условиях гербицидного загрязнения важную информацию для выявления действия специфического токсического агента дают исследования энергетического обмена в органах карпа в модельных условиях. Одна из основных опасностей воздействия любого ксенобиотика на организм заключается в энергетических затратах на мобилизацию механизмов его

детоксикации. Цель исследования состоит в изучении действия гербицида раундап на параметры энергетического обмена в органах двухлеток карпа и возможность компенсации его негативного действия с помощью пробиотического препарата БПС-44. Действующим веществом глифопина (утала, цидокора, N-фосфонометилглицина) является изопропиламинная соль глифосата. Он был выведен на рынок компанией "Монсанто". Это самый продаваемый в мире гербицид, который в последнее время часто применяется на трансгенных растениях, так как большая их часть имеет устойчивость к этому химикату. В связи с этим эти растения, в частности трансгенная соя, могут переносить большие дозы химиката, не погибая и поэтому содержать остаточные количества токсического раундапа. Как стало известно Biosafety.ru, учёные впервые исследовали механизмы токсического действия четырех различных составов гербицида "Раундап", используя для этого человеческие клетки. Специалисты Университета г. Каена во Франции Нора Бенакур (Nora Benachour) и профессор Жиль-Эрик Сералини (Gilles-Eric Se'ralini) опубликовали результаты своей работы в американском научном журнале *Chemical Research in Toxicology* 23 декабря 2008 года в статье "Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells". Для исследования были отобраны клетки пуповинной крови новорожденных и определены воздействие на них минимальной дозы состава гербицида "Раундап" (раствор 1 к 100 тысячам и более), это такая пропорция, в которой этот состав уже не является гербицидом. Через несколько часов обнаружилось, что клетки запрограммированы на смерть. Также были выявлены разрушения мембраны и ДНК. Выяснилось, что раундап препятствует клеточному дыханию, поэтому так важно изучить его воздействие на энергетический обмен рыб.

Эксперименты по влиянию раундапа осуществляли в 200-литровых непроточных аквариумах, в которые рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40л воды (двухлетки карпа) в трех вариантах. Первый – это контроль, второй – действие 2 ПДК (предельно допустимые концентрации) гербицида ($0,04\text{мг/дм}^3$); третий – совместное влияние гербицида и пробиотического препарата БПС-44 с титром жизнеспособных клеток $1,25 \times 10^8$ КОЕ (колоний образующих единиц)/л, который добавляли в воду за 1 сутки до внесения глифосата. Бациллярный субтилис БПС-44 был разработан в Институте сельскохозяйственной микробиологии УНААН на основе штамма *Bacillus subtilis*-44-p и активно используется в ветеринарии и медицине для коррекции нарушений физиологических процессов у молодняка крупного рогатого скота (Агеев та ін., 2008). Длительность эксперимента составила 7-14 суток, замену воды проводили каждые два-три дня. Во всех случаях контролировали и поддерживали постоянный гидрохимический режим. Величина рН составила $7,90 \pm 0,27$; содержимое кислорода – $5,7 \pm 0,6$ мг/л, температура воды отвечала естественной ($+10 - +12^\circ\text{C}$). Для анализа содержания аденилатов (Маляревская и др., 1987) замороженные ткани растирали в порошок, из которого затем делали навески для определения макроэргических соединений, не допуская их размораживания. Для оценки участия АТФ, АДФ, АМФ в метаболической регуляции рассчитывали следующие коэффициенты состояния клетки: аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) (Гош, 1985; Ленинджер, 1985):
$$\text{АЭЗ} = \frac{\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ}}{\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}}$$

потенциал, отношение действующих масс аденилаткиназной реакции $\text{ДМ}_{\text{АК}} = \frac{\text{АТФ} * \text{АМФ}}{[\text{АДФ}]^2}$.

Статистично результаты обработаны общепринятыми методами с использованием стандартных компьютерных программ, достоверное расхождение между средними арифметическими величинами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при * - $P < 0,05$.

Эксперимент проводился ранней весной, соотношение макроэргических соединений по тканям в контрольной группе рыб соответствует раннее полученным результатам: наибольшее количество АТФ – в печени ($4,339 \pm 0,001$ мкмоль/г) и наименьшее – в мозге ($0,877 \pm 0,029$ мкмоль/г). Общая сумма всех аденилатов варьировала в достаточно широких пределах: от $9,026$ мкмоль/г (7 сутки, печенька) до $0,740$ мкмоль/г (14 сутки, мозг) (рис. 1-3). На 14 сутки наблюдается существенное снижение общего содержимого аденилатов: среднее значение составляет $1,165$ мкмоль/г ($0,752$ мкмоль/г в белых мышцах, $2,002$ мкмоль/г в печеньке и $0,740$ мкмоль/г в мозге). Такое снижение общего содержимого аденилатов в сравнении с 7 сутками может быть объяснено отсутствием кормления рыб в условиях эксперимента.

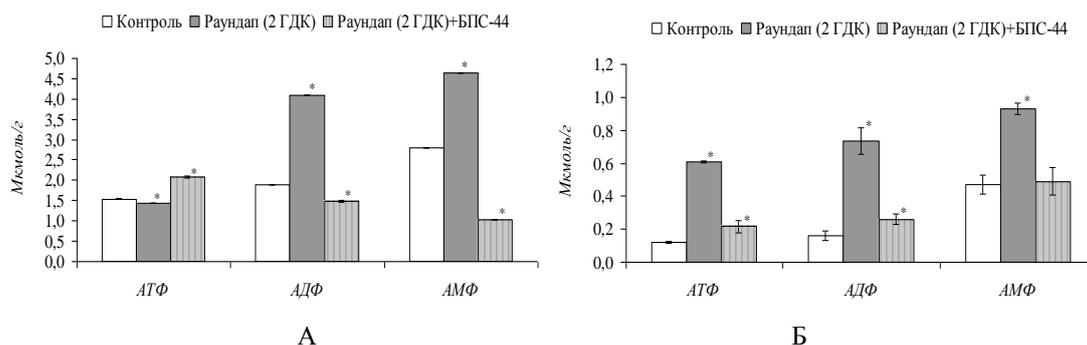


Рис. 1. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в белых мышцах карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Рассмотрим влияние раундапа и совместимое действие гербицида и БПС-44. На 7 сутки во всех исследуемых тканях двухлеток карпа (рис. 1-3) раундап вызвал снижение уровня АТФ, причем наименьшее – в белых мышцах, а наибольшее – в мозге. Что касается содержания АДФ, то здесь показатели неоднозначны: достоверное увеличение в белых мышцах и также достоверное, но снижение – в печени и мозге. Для количественных изменений АМФ характерна тенденция к уменьшению в печени, а в мозге и в белых мышцах – достоверное увеличение данного показателя. Значит, под влиянием раундапа начинается активное расщепление АТФ для обеспечения процессов его детоксикации, особенно в печени карпа.

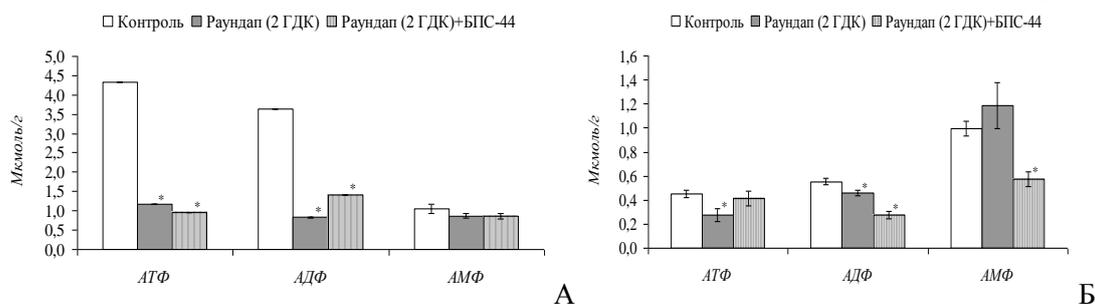


Рис. 2. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в печени карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Этот процесс продолжается и на 14 сутки эксперимента, что подтверждается уменьшением количеств АТФ в 1,6 раза; АДФ – на 21 % и наоборот увеличение АМФ – на 16 %. О наличии негативных тенденций в печени свидетельствует снижение аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) на 27,7%, отношения действующих масс АТФ-системы на 53%. Объяснением полученных результатов могут служить гистологические изменения ткани печени – распространение вакуольно-капельной дистрофии, которое приводит к некрозу гепатоцитов и функциональной недостаточности органа. Под влиянием БПС-44 активность протекания энергетического обмена в печени двухлеток карпа возрастает, что подтверждается увеличением отношения АТФ/АДФ в 2 раза, АЭЗ до величины 0,437 и фосфорилированием системы АТФ-АДФ (рост отношения действующих масс АТФ-системы до 0,500) (табл. 1). Для белых мышц на 14 сутки действия гербицида характерно достоверное увеличение всех показателей энергетического состояния клетки, особенно содержания АТФ в 5,1 раза, АДФ – в 4,6 раза и АМФ – в 2 раза и только отношение действующих масс аденилаткиназной реакции уменьшается вдвое. Это свидетельствует о замедлении расходования энергетических субстратов в белых мышцах и преобладании процессов катаболизма над реакциями анаболизма, что показано в раннее проведенных исследованиях об ингибировании раундапом реакций анаболизма. Действие пробиотического препарата в белых мышцах карпа приводит на 7 сутки к небольшому, но достоверному увеличению по отношению к контролю содержания АТФ на 25,8% и на 14 сутки на 44,7%. По отношению, же к действию раундапа на 14 сутки происходит снижение всех показателей энергетического обмена или практически близкие их значения. Значит, действие БПС-44 компенсирует влияние раундапа, а биохимические показатели мышечной ткани возвращаются к своему исходному уровню.

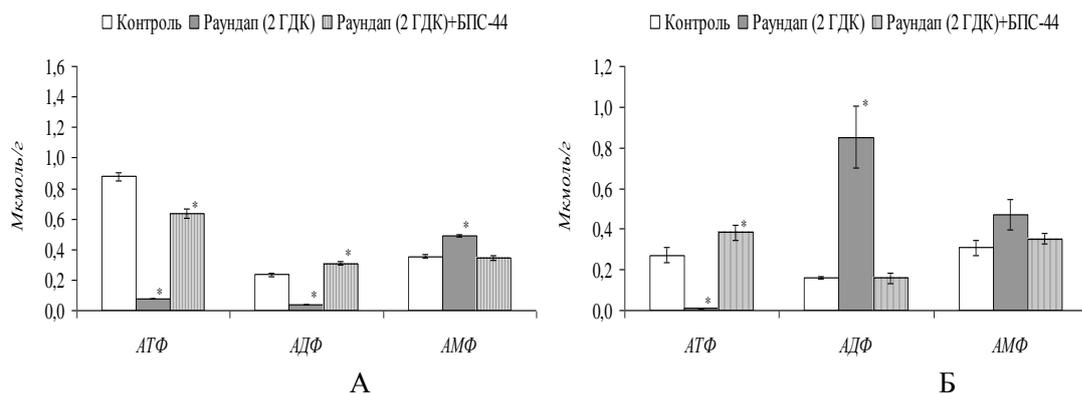


Рис. 3. Содержание аденилатов (мкмоль/г) в мозге карпа в условиях действия раундапа (2 ПДК) и БПС-44 (А — 7 сутки, Б — 14 сутки; $M \pm m$, $n = 6$, * — $P < 0,05$).

Наиболее негативные последствия действия раундапа испытывает на себе мозг двухлеток карпа. Так, уровень АТФ снизился в 30 раз, а количество АДФ увеличилось в 5,3 раза, уровень АМФ вырос – на 34,9%, количество неорганического фосфора на 35%.

Таблица 1. Значение показателей состояния аденилатной системы в тканях карпа

| 14 сутки | | | |
|--------------------|-------------|--------------|----------------|
| | Контроль | Раундап | БПС-44+Раундап |
| Белые мышцы | | | |
| P_i (в мкмоль/г) | 5,258±0,236 | 7,740±0,012* | 10,350±0,029* |
| АТФ/АДФ | 0,745 | 0,826 | 0,831 |
| АТФ/(АДФ × P_i) | 0,142 | 0,107 | 0,080 |
| АЭЗ | 0,267 | 0,429 | 0,348 |
| ДМ _{АК} | 2,180 | 1,044 | 1,558 |
| Печень | | | |
| P_i (в мкмоль/г) | 5,173±0,085 | 8,420±0,006* | 6,230±0,437* |
| АТФ/АДФ | 1,465 | 1,560 | 3,117 |
| АТФ/(АДФ × P_i) | 0,283 | 0,185 | 0,500 |
| АЭЗ | 0,364 | 0,263 | 0,437 |
| ДМ _{АК} | 1,475 | 1,560 | 3,117 |
| Мозг | | | |
| P_i (в мкмоль/г) | 4,922±0,250 | 6,640±0,223* | 2,746±0,006* |
| АТФ/АДФ | 1,683 | 0,011 | 2,418 |
| АТФ/(АДФ × P_i) | 0,342 | 0,002 | 0,882 |
| АЭЗ | 0,475 | 0,326 | 0,517 |
| ДМ _{АК} | 3,220 | 0,006 | 5,386 |

Такие изменения этих показателей характеризуют активное использование энергии АТФ в мозге, которое также подтверждается резким снижением других параметров, а именно: отношения АТФ/АДФ, отношения действующих масс АТФ-системы, АЭЗ и особенно отношения действующих масс аденилаткиназной реакции. Такие изменения автоматически приведут к повышению скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования, т.е. к усилению регенерации АТФ из АДФ, но в мозге двухлеток карпа питательных субстратов для аэробного ресинтеза АТФ недостаточно, что приведет к разбалансировке аденилатной системы. Действие пробиотика БПС-44 направлено на нормализацию энергетических показателей и снижение скорости катаболических реакций, на что указывает увеличение в 2,6 раза ДМ_{АК}.

Таким образом, действие гербицида раундап на энергетические показатели в различных тканях двухлеток карпа – неоднозначно, особенно на 14 сутки эксперимента. Если в белой

мускулатуре происходит снижение скорости реакций энергетического обмена, то в печени происходит интенсивное расходование макроэргических соединений с целью детоксикации поступающего гербицида. Для мозга характерны наиболее негативные явления, свидетельствующие о разбалансировке аденилатной системы. Использование пробиотического препарата БПС-44 оказывает положительное действие – способствует восстановлению исходных контрольных значений основных параметров энергетического обмена в тканях двухлеток карпа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантний та імунний статус молодяку ВРХ за дії пробіотичних препаратів БПС-44 та БПС-Л // [В.О.Агеев, С.В.Дерев'янка, Г.М.Дяченко та ін.] // Науковий вісник Львівського націон. університету ветерин. медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. 2008. Т. 10, №3. Ч. 1.- С. 10-17.
2. Гош Р.И. Энергетический обмен половых клеток и эмбрионов у рыб. / Р.И. Гош К.: Наукова думка, 1985. 146 с.
3. Ленинджер А.Л. Основы биохимии. / А.Л. Ленинджер М.: Мир, 1985. 368 с.
4. Маляревская А.Я. Влияние голодания и различного кормления на обмен макроэргических соединений и белков в белых мышцах карпа / А.Я. Маляревская, Т.И. Билык // Гидробиол. Журн. 1987. 23, № 6. С. 61-66.

ADAPTATIONS OF ENERGY METABOLISM OF CARP YEARLINGS IN THE CONDITIONS OF ACTION OF ROUNDUP AND PROBIOTIC

A.A. Zhidenko, E.V. Barbukho, V.V. Krivopisha

The changes in parameters of energy metabolism of carp yearlings under the action of the herbicide roundup (2 MAC – 0,04 mg/dm³) is examined. The ambiguity of reactions is shown depending on the type of tissue. Application of probiotic preparation BPS-44 has a positive effect – assists renewal of initial control values of basic parameters of energy metabolism in carp yearling's tissue.

СТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТА РЫБ КАК ОТРАЖЕНИЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ОРГАНИЗМА К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.

Заботкина Е.А.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

Печень является уникальной многофункциональной экзо- и эндокринной железой, участвующей в работе и осуществляющей регуляцию работы многих систем организма (Хэм, Кормак, 1983). Основная структурная единица печени – гепатоцит, составляющий до 95% всех клеток печени. Его тонкая структура отражает сложность функциональной нагрузки печени в целом. Пространственная ориентация гепатоцита с разделением структуры апикальных и базальных участков определена способностью клетки секретировать вещества в разных направлениях – как в кровоток – кровеносные синусы органа, так и желчные протоки, выделяющие секрет в пищеварительный тракт. Структура гепатоцита рыб в общих чертах подобна гепатоциту других позвоночных.

Загрязнение водоемов отходами промышленных и сельскохозяйственных предприятий, рекреационной нагрузки и сбросов неочищенных бытовых стоков создает неблагоприятный фон для обитания гидробионтов, в том числе рыб. Рыбы, как верхнее звено пищевых цепей в экосистемах водоемов, накапливают токсиканты. Печень, как основной орган детоксикации, и гепатоцит, как клетка, осуществляющая ее, часто становятся мишенями для токсикантов, а структура клетки отражает способность органа и организма в целом адаптироваться к действию токсических веществ.

Одной из наиболее часто регистрируемых при действии токсикантов различной природы и загрязнении среды реакций со стороны клеточных органоидов – изменение структуры митохондрий. Оно выражается как в их набухании за счет увеличения объема митохондриального матрикса при одновременном регистрировании его просветления, так и

повреждении ламелл внутренней мембраны митохондрий – их уменьшении и полном исчезновении. Это, как правило, делает затруднительным процесс окислительного фосфорилирования и ведет к переходу клетки на более затратный способ получения энергии – гликолиз, и сопряжен с уменьшением или полным исчезновением запасов гликогена в клетках (Заботкина, Микряков, 1997) (Рис. 1).

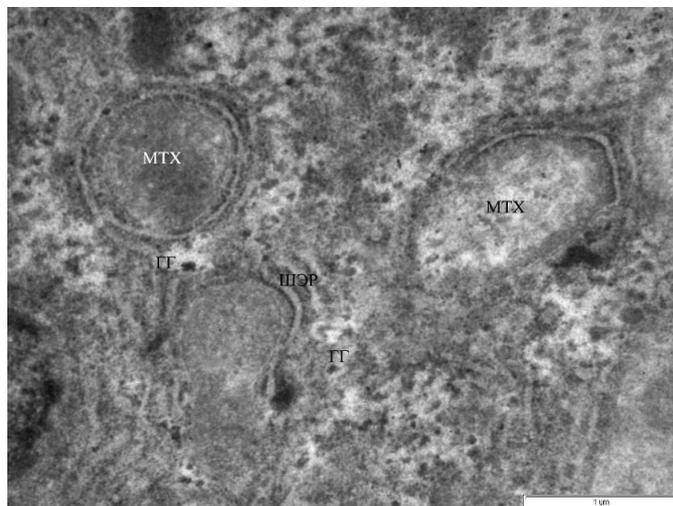


Рис. 1. Участок цитоплазмы гепатоцита окуня из оз. Рдейское. ГГ – гранула гликогена, МТХ - митохондрия, ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум.

Подобные изменения отмечены как в гепатоцитах печени при низких значениях рН и действии пестицидов и тяжелых металлов, так и в эпителиальных клетках, лейкоцитах и т.д. (Заботкина, Микряков, 1997; Заботкина, 2010).

Этот признак проявляется на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях и представляет собой комплекс защитных реакций, позволяющих как локализовать и минимизировать действие повреждающих факторов, так и предоставить необходимую для функционирования организма энергию. Обнаружение данных изменений позволяет сделать выводы не только о состоянии здоровья рыб, но и степени загрязненности среды.

При старении клетки отмечено увеличение гетерохроматина в ядре, набухание митохондрий, дальнейшее просветление их матрикса, «растворение» ламелл, появление расширенных каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума (Рис. 2). Это свидетельствует о снижении энергетической активности митохондрий, а большие скопления гранул гликогена в цитоплазме позволяет предположить, что данная клетка находится на низком уровне активности, и скорее играет роль запасящего энергетические вещества отдела органа.

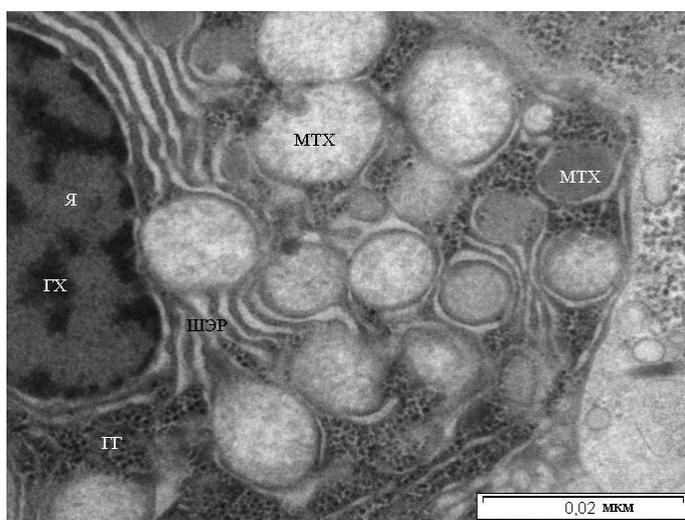


Рис. 2. Участок цитоплазмы гепатоцита печени окуня из оз. Рдейское (Рдейский заповедник). ГХ – гетерохроматин, Я – ядро.

О снижении энергетических потребностей свидетельствует и пространственное перераспределение органоидов. В печени окуней, выловленных в оз. Большое Горещкое (Рдейский заповедник) отмечены зональное распределение цитоплазмы, более плотное в перинуклеарной зоне и по периметру клетки, очень небольшое количество митохондрий и практически полное исчезновение гранул гликогена из цитоплазмы. Цистерны ШЭР были локализованы в основном вокруг митохондрий. Апикальные участки клеток содержали липидоподобные включения и секреторные вакуоли, пространства Дисса были расширены (Рис. 3). Подобная структура клетки отмечена и в печени лещей, выловленных в Моложском плесе Рыбинского водохранилища, относящегося к наиболее загрязненной части водоема.

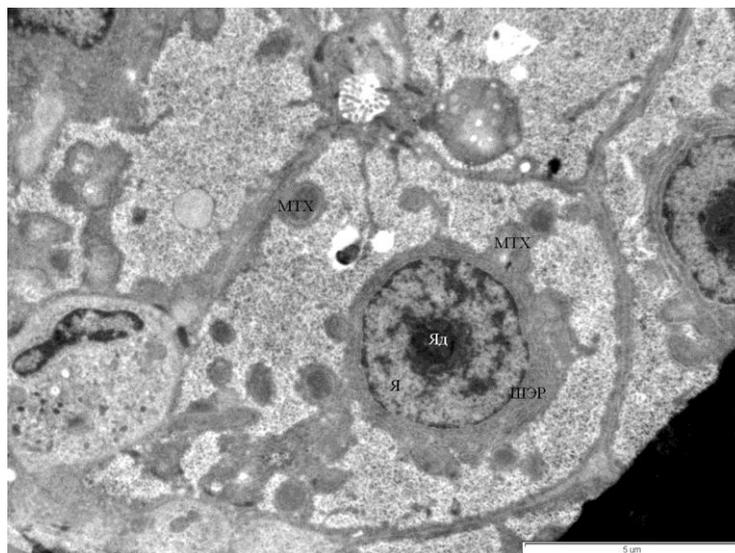


Рис. 3. Гепатоцит печени окуня из оз. Большое Горещкое. Яд – ядрышко. Остальные обозначения те же.

У рыб, обитающих в водоемах с кислыми рН, наблюдается усиление плотных контактов между клетками, препятствующими их разрушению. Подобное явление обнаружено у окуней из «кислых» озер Дарвинского и Рдейского заповедников (Заботкина, Комов, 1999; Заботкина, 2009). Этот признак проиллюстрирован в гепатоцитах окуней из оз. Корниловское, где между клетками наблюдали хорошо видимые десмосомы с пучками микротрубочек, глубоко проникающими в цитоплазму клеток (Рис. 4).

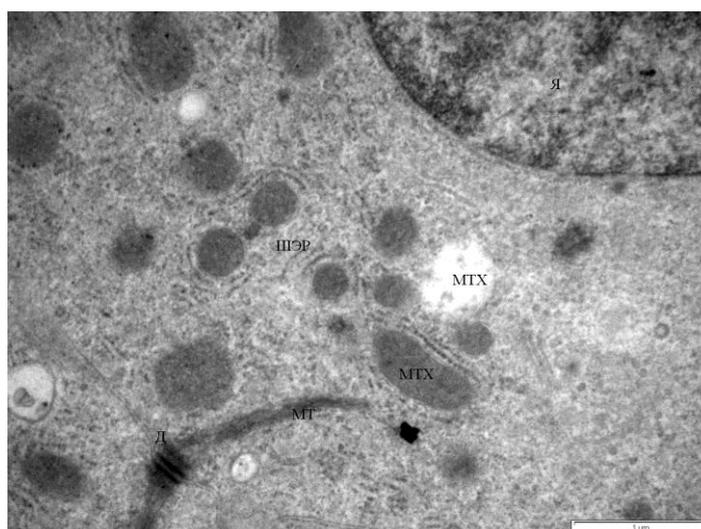


Рис. 4. Участок цитоплазмы гепатоцита печени окуня из оз. Корниловское (Рдейский заповедник). Д – десмосома, МТ – микротрубочки. Остальные обозначения те же, что на предыдущих рисунках.

Попадание токсикантов, закисление среды часто вызывают усиление секреторной активности гепатоцитов. Это выражается в большом количестве секреторных вакуолей в апикальных участках клеток и расширении пространства Дисса (Рис. 5).

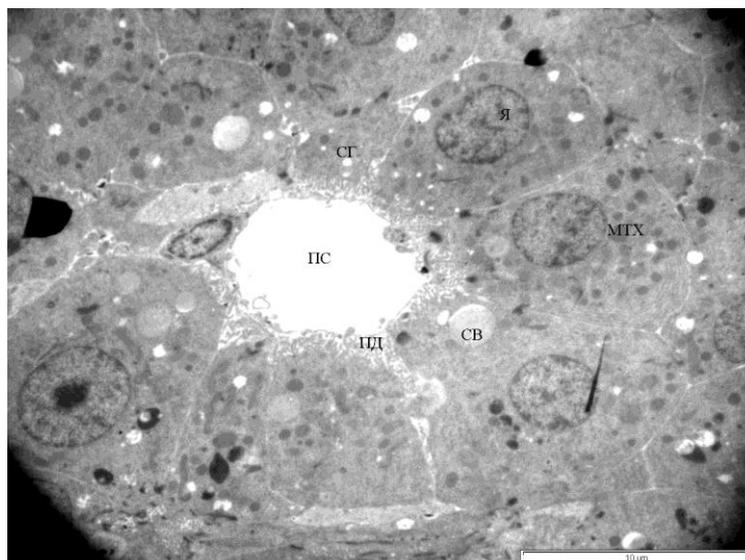


Рис. 5. Структура кровеносного синуса печени окуней оз. Корниловское. ПД – пространства Дисса, ПС – просвет синуса, СВ – секреторная вакуоль, СГ – секреторная гранула. Остальные обозначения те же.

Анализ собственных и литературных данных позволяет сказать, что при всех возможных вариантах, гепатоцит приобретает структуру, позволяющую обеспечить оптимальные условия для функционирования организма: расширение пространств Дисса, усиление секреторной активности гепатоцитов, изменение характера межклеточных контактов. По-видимому, эти изменения являются защитной и адаптивной реакцией со стороны клетки на факторы внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Заботкина Е.А., Комов В.Т. Сравнительная характеристика клеток печени окуня из озер с различным уровнем рН воды// Ж. эволюц. биохим. и физиол. 1999. № 6. С.521-526.
2. Заботкина Е.А., Микряков В.Р. Реакция иммунокомпетентных клеток печени карпа на воздействие карбофоса// Доклады РАН. 1997. Т.352. N 4. с.562 - 564.
3. Виноградов Г.А., Гдовский П.А., Матей В.Е. Закисление водоемов и его влияние на метаболизм у пресноводных животных//Физиология и паразитология пресноводных животных. Л., 1979. 185 с.
4. Комов В.Т., Лазарева В.И. Причины и последствия антропогенного закисления поверхностных вод Северного региона на примере сравнительно-лимнологического исследования экосистем озер Дарвинского заповедника//Структура и функционирование экосистем кислотных озер. СПб, 1994. С.3-30.
5. Хэм А., Кормак Д. Гистология. М.: Мир. 1983. В 5-ти томах. Т. 4. 256 с.
6. Заботкина Е.А. Сравнительно-морфологическая характеристика клеток печени окуней *Perca fluviatilis* L. озер Рдейского заповедника//Труды Гос.ж природного зап-ка «Рдейский» Вып. 1. Великий Новгород: Типография «Виконт», 2009. С. 93-101.

FISH HEPATOCYTES STRUCTURE AS A REFLECTION OF ORGANISM'S ADAPTATION TO ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Zabotkina E.

ID Papanin` Institute for Biology of Inland Waters of RAS, Borok, Russia

e-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

The paper discusses the major changes in the fine structure of hepatocytes, allowing the cell to function optimally. Marked by characteristic changes in the ultrastructure of hepatocytes in the acidification, process of aging, injury toxicants.

ОБМЕН И РЕГУЛЯЦИЯ КАТИОНОВ У ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ В НОРМАЛЬНЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Р.А. Запруднова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

Борок Ярославской обл, Россия

E-mail: rimma@ibiw.yaroslavl.ru

Цель настоящей работы состояла в выявлении общих механизмов адаптации в системе водно-солевого равновесия рыб к стрессорам разной силы и длительности. Для этого изучали динамику содержания ионов натрия, калия, кальция и магния в плазме крови и обмен ионов натрия и калия между организмом и водой в ответ на действие стрессоров, различающихся по количеству и качеству. Кроме того исследовали закономерности изменения ионных показателей у рыб в течение года.

Объектами исследования служили 7 видов рыб отловленных в Рыбинском водохранилище: лещ (*Abramis brama* L.), плотва (*Rutilus rutilus* L.), щука (*Esox lucius* L.), окунь (*Perca fluviatilis* L.), налим (*Lota lota* L.), синец (*Abramis ballerus* L.) и карась серебряный (*Carassius auratus* L.). Всего изучено около 3 тыс. экз. рыб разных видов. Большую часть исследований проводили на половозрелых и близких к половозрелости особях.

За нормальное принимали состояние здоровых, не травмированных рыб, адаптируемых после отлова в течение двух и более недель в лабораторных бассейнах или прудах экспериментальной базы. Плотность посадки — 1 особь на 200-2500 л воды при 100% насыщении воды кислородом.

Несильные непродолжительные стрессоры: инъекция адреналина или норадреналина в дозах от 0.2 до 1.5 мг/кг; введение физиологического раствора (0.7% раствор хлористого натрия); укол шприцем; разного рода манипуляционный стресс (хэндлинг) в течение 1—2 мин, пересадка рыб в аквариумы меньшего объема; плавное, обратимое изменение температуры воды на 3—5°C в благоприятной температурной области (близкой к избираемой); быстрый отлов из естественной среды обитания при невысоких температурах воды (0.1—7°), дальнейшая непродолжительная транспортировка в больших объемах воды при низкой температуре.

Сильные непродолжительные стрессоры вызывали три вида реакций:

1. Острый обратимый стресс возникал на: резкое изменение температуры воды на 10—23°C в диапазоне толерантности; резкую деминерализацию воды в сочетании с другими стрессорами; отлов, транспортировку или их имитацию продолжительностью от 15 мин до 3 ч при достаточно высоких температурах воды (17—22°); инъекцию адреналина в дозах 2—3 мг/кг; помещение в аквариум с мирными рыбами крупного хищника.

2. Острый стресс с летальным исходом продолжительностью 5—96 ч вызывался стрессорами чрезмерной силы (абиотическими факторами в летальных дозах): перенос рыб за пределы температурной толерантности; снижение содержания кислорода в воде до 2.5 мг/л; комплексное действие нескольких факторов в предлетальных дозах: температуры, кислорода, адреналина, солености, ограниченного объема воды (приводящего к иммобилизации), механических раздражений. Ослабленные особи погибали от раздражителей значительно меньшей силы.

3. Подострый стресс с летальным исходом продолжительностью от 5 до 20 дней (главным образом, до 2 недель) вызывался достаточно сильными стрессорами, к которым рыба не могла приспособиться: содержанием рыб в садках и маленьких аквариумах (концентрация аммония в последнем сл повышалась до 80 мг/л); посттравматическими эффектами продолжительного траления и длительного пребывания в сетях, а также жестких условий транспортировки в лабораторию; суточным колебанием температур в неблагоприятных температурных условиях.

Несильные продолжительные стрессоры. В работе рассматривался преимущественно хронический стресс с летальным исходом продолжительностью 1—4 мес, который вызывался содержанием рыб в лабораторных аквариумах, бассейнах и прудах экспериментальной базы в условиях значительного варьирования температурного, кислородного, солевого, светового режимов, а также с различной концентрацией ионов аммония в воде. Анализировалось влияние голодания, болезней, времени года.

В качестве стресса также рассматривали нерест.

Концентрацию катионов в плазме крови и воде определяли спектрофотометрическим методом на приборе "Flapho-4" (калий, натрий) и AAS-1 (кальций, магний).

Показано, что ответная реакция системы водно-солевого равновесия у пресноводных рыб при стрессе зависит от количества (силы и продолжительности) воздействия. На примере натрия, основного иона, определяющего энергетику наружной мембраны животных клеток, эта зависимость выглядит следующим образом. Под влиянием несильных и непродолжительных стрессоров (кратковременный отлов при невысоких температурах воды или легкий хэндлинг в лабораторных условиях, небольшое изменение температуры воды в толерантном диапазоне и другие факторы), а также в период размножения содержание натрия в плазме крови пресноводных рыб может увеличиваться в среднем на 10%. Примерно на столько же снижается концентрация натрия при хроническом стрессе (вызываемом длительным содержанием в недостаточно благоприятных условиях лабораторных аквариумов и прудов экспериментальной базы), а также и сразу после нереста. При подостром стрессе с летальным исходом (вызываемом сильными стрессорами, к которым рыбы не могут приспособиться) гипонатриемия достигает 20%. При очень сильном остром стрессе (возникающем при действии летальных нагрузок или нескольких факторов в предлетальных дозах) потери натрия из внутренней среды приближаются к 50% — и, как следствие, животные быстро погибают. Максимально возможная гипонатриемия, при которой рыбы остаются живыми, наблюдаемая при сильном остром обратимом стрессе (например, при отлове и транспортировке) и гипобиозе (в околонулевых температурах), может составлять 30%. Гипернатриемия при несильных непродолжительных нагрузках коррелирует с усилением абсорбции ионов из воды, а гипонатриемия при действии сильных стрессоров связана с усилением потерь натрия в окружающую среду. При хроническом и подостром стрессе наблюдается равновесие потерь и абсорбции ионов практически на протяжении всего опыта.

Содержание во внутренней среде ионов калия (с которыми связываются основные поляризационные процессы на мембране клеток и явления возбуждения и торможения) изменяется при стрессе и нересте в противофазе с динамикой концентрации натрия. Отмечена гипокалиемия (70-90%) во время несильных непродолжительных нагрузок и при нересте, и гиперкалиемия (60-100-400%) — при действии сильных стрессоров. При хроническом и подостром стрессе, а также во время гипобиоза и после нереста содержание ионов калия в плазме крови близко к норме, однако возможна невысокая гиперкалиемия. При несильных непродолжительных нагрузках наблюдали увеличение активного транспорта ионов калия из воды. При сильном остром стрессе гиперкалиемия обычно коррелировала с утечкой ионов в воду, усиливающейся в ходе стресса. Полученные данные позволяют говорить о равновесии потерь и абсорбции ионов калия на протяжении длительного периода хронического стресса и значительном усилении диффузии перед гибелью. Обнаружена также большая утечка ионов в ходе подострого стресса, однако общее количество потерянных организмом ионов калия перед гибелью одинаково при хроническом и подостром стрессе.

Содержание ионов кальция в плазме крови увеличивается при несильных непродолжительных нагрузках и во время нереста (до 15-30% и более). При сильных нагрузках и после нереста концентрация кальция во внутренней среде, напротив, снижается (до 30% и более). Обнаружено противофазное с кальцием изменение концентрации магния в плазме крови. При действии несильных непродолжительных стрессоров и перед нерестом содержание магния во внутренней среде организма рыб может уменьшаться на 10% и более, а при непродолжительном сильном стрессе — повышаться до 60% и более.

В результате проведенных исследований выявлены общие механизмы адаптации в системе водно-солевого равновесия пресноводных рыб, связанные с количеством (силой и продолжительностью) стрессора. Под влиянием несильных непродолжительных нагрузок разной природы, а также во время нереста усиливаются активные ионные потоки через мембраны клеток и тканей. При длительном действии несильных стрессоров, а также сразу после нереста и во время гипобиоза активные и пассивные ионные процессы ослабевают, но пассивные преобладают. Под влиянием сильных непродолжительных нагрузок увеличиваются и активные и пассивные ионные потоки, но пассивные доминируют. С усилением стресса активные ионные потоки ослабевают и перед гибелью рыб снижаются до нуля. Таким образом, можно заключить, что при несильных

непродолжительных нагрузках и перед нерестом в организме формируется функциональная система, которой свойственны повышенные ионные концентрационные градиенты на мембране клеток и тканей. Для всех остальных стрессовых ситуаций характерны функциональные системы со сниженными концентрационными градиентами. Самая неэффективная (в связи с максимальным ионным дисбалансом и минимальной продолжительностью жизни) – при остром стрессе с летальным исходом. Функциональная система при хроническом стрессе обладает большими адаптивными возможностями: минимальным ионным дисбалансом и большой продолжительностью жизни рыб. Функциональная система при подостром стрессе по величине ионного дисбаланса и продолжительности жизни рыб занимает промежуточное положение между описанными двумя. Для функциональной системы при гипобиозе характерны обратимые, но большие по величине и длительности изменения ионных параметров по типу редукиции. В начальный период сильного острого обратимого стресса также возможны большие по величине отклонения ионных показателей в сторону снижения ионных концентрационных градиентов на мембране клеток и тканей.

На основании проведенных исследований предлагается концепция двух разных защитных реакций или двух стратегий адаптации у пресноводных рыб в нормальных и экстремальных условиях: активной и пассивной, состоящих, соответственно, в повышении уровня неравновесности (энергетики) и снижении уровня неравновесности (или, следовательно, повышении конформности) организма. С точки зрения поляризационных процессов на клеточной мембране первую стратегию адаптации можно обозначить как гиперполяризационное торможение, а вторую – как деполяризационное. Первая стратегия обеспечивает прогрессивное развитие организма и наиболее полную реализацию его функций. Предполагается, что энергия увеличенных ионных концентрационных градиентов на мембране клеток и тканей определяет избыточные анаболические процессы и повышение устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов. Вторая стратегия адаптации обеспечивает сохранение жизни в экстремальных условиях. При хроническом стрессе, а также гипобиозе это осуществляется путем минимизации энергозатрат: за счет снижения концентрационных градиентов и ослабления ионотранспортных потоков. Что, вероятно, и определяет метаболическую депрессию. При сильном остром стрессе, напротив, в борьбе за выживание расходуются большие количества энергии, которые, по-видимому, высвобождаются в результате быстрого и значительного снижения ионных концентрационных градиентов. При подостром стрессе поддержание жизни происходит за счет использования энергии сильных катаболических процессов (на что указывают большие потери калия и аммония) в условиях заметно заниженных концентрационных градиентов натрия. Таким образом, эволюционно более древняя приспособительная реакция – повышение конформности организма – включается в чрезвычайных обстоятельствах, когда не могут быть реализованы эволюционно более молодые механизмы адаптации, обеспечивающие необходимый для нормальной жизнедеятельности уровень неравновесности живой системы. Представленные положения о двух стратегиях адаптации у рыб в нормальных и экстремальных условиях согласуются с мнением Н.С. Строганова (1979) о 2-х группах регуляторных процессов у гидробионтов: текущих, проявляющихся на малые концентрации токсиканта и чрезвычайных, включающихся при больших концентрациях, или о 2-х типах ответных реакций (стимуляции и депрессии), а также с положениями теории эустресса и дистресса (Селье, 1979), или стресса физиологического и патологического (Аршавский, 1982).

На основании предложенной концепции двух стратегий адаптации в нормальных и экстремальных условиях (активной и пассивной) сформулированы основные принципы диагностики рыб в природной и искусственной среде обитания по состоянию системы водно-солевого равновесия. Отклонения в сторону снижения ионных концентрационных градиентов на мембране клеток и тканей предлагается рассматривать как показатель той или иной степени неблагополучия (патологии), изменения в противоположном направлении: в сторону повышения концентрационных градиентов как предвестник возможной патологии в условиях продолжающегося стресса. Переход через фазу гиперкомпенсации (стимуляции) к фазе редукиции (депрессии) — общая закономерность в ответной реакции биологических систем разного уровня организации на возрастающий стимул или непрекращающееся его действие в

прежней интенсивности. Состояние ареактивности занимает промежуточное положение между фазами гиперкомпенсации и редукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аршавский И.А.* Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. М.: Наука, 1982. 270с.
2. *Селье Г.* Стресс без дистресса. М.: Прогресс, 1979. 125 с.
3. *Строганов Н. С.* Теоретические вопросы экологической физиологии рыб в связи с усилением токсичности водной среды // В кн: Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука, 1979. С. 19-34.

EXCHANGE AND REGULATION OF CATIONS IN FRESHWATER FISH IN NORMAL AND EXTREME CONDITIONS

R.A. Zaprudnova

The concentration of sodium, potassium, calcium and magnesium ions in the blood plasma and ion exchange of sodium and potassium between the organism and water in response to stressors, which differ in quantity and quality are investigated. The concentration and exchange of ions in annual cycle too are investigated. The general mechanisms of adaptation in the system water-salt balance, depending on the strength and duration of the stressor have been found. The concept of two strategies of freshwater fish's adaptation in normal and extreme conditions is proposed.

ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ КАТИОНЫ В АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ У РЫБ

Р.А. Запруднова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
Борок Ярославской обл, Россия
rimma@ibiw.yaroslavl.ru*

Катионы в эритроцитах позвоночных животных выполняют различные функции. При этом главное свойство ионного окружения связывается с обеспечением оптимальных условий для работы гемоглобина (Хочачка, Сомеро, 1988). В настоящем исследовании концентрацию эритроцитарных катионов магния, натрия, калия и кальция изучали у рыб в условиях экспериментальных стрессовых нагрузок и в течение годового цикла. Исследовали 9 видов рыб, отловленных в бассейне реки Волги: семейство *Cyprinoidae* (карповые) – *Carassius auratus* (карась серебряный), *Tinca tinca* (лещ), *Cyprinus carpio* (каarp), *Rutilus rutilus* (плотва), *Abramis brama* (лещ); сем. *Gadidae* (тресковые) – *Lota lota* (налим); сем. *Percidae* (окуневые) – *Perca fluviatilis* (окунь); сем. *Esocidae* (щуковые) – *Esox lucius* (щука); сем. *Acipenseridae* (осетровые) *A. ruthenus* (стерлядь). Анализировали также литературные данные по некоторым другим видам рыб. Леща использовали во всех опытах, остальные виды рыб представлены лишь в некоторых опытах. Исследовали половозрелых особей. Концентрацию ионов в эритроцитах анализировали спектрофотометрическим методом, а уровень катехоламинов в крови и хромоаффинной ткани – флуориметрическим. За нормальное принимали состояние рыб после 14 дневной и более продолжительной адаптации в искусственных условиях, максимально приближенных к естественным. Подробнее об условиях содержания рыб и применяемых стрессорах см. в настоящем сборнике в другой работе (Запруднова, 2012).

Виды рыб, устойчивые к гипоксии (карась, лещ, карп, сом, угорь) имели в эритроцитах более высокое содержание ионов магния и калия и низкое – натрия, чем виды, менее устойчивые к недостатку кислорода в воде (форель, судак, синец, лещ, плотва, язь, окунь, щука, налим). Однако внутривидовые изменения ионного состава эритроцитов у рыб при стрессе столь велики, что могут перекрывать межвидовые различия этих показателей.

Магний. На леще, карасе, лине выявлена зависимость изменения концентрации магния в эритроцитах от интенсивности стрессовой нагрузки разной природы. Непродолжительные слабые и средние по силе воздействия (низкие дозы адреналина, норадреналина, небольшие изменения температуры воды, введение физраствора, укол в брюшную полость, кратковременное извлечение рыб из воды и 1-5 мин. помещение в небольшой объем воды и др.)

увеличивали концентрацию магния в эритроцитах в 1.8-2.7 раза, а те же факторы, но в более высоких дозах, а также комплексные воздействия сильных стрессоров (гипоксия, ограниченный объем воды, механические воздействия, деминерализация воды и др.) снижали содержания магния в эритроцитах в 1.6-2.3 раза. Диапазон колебания концентрации магния в эритроцитах при стрессе у рыб самый большой из исследуемых четырех катионов: например, у леща от 4-5 ммоль/л до 22-27ммоль/л, т.е. имеет место более чем пятикратное изменение уровня этого катиона. С ухудшением состояния (истощенные, ослабленные, больные животные), а также на фоне уже существующей нагрузки рыбы становились мало или совсем не чувствительны к слабым раздражителям (изменения реактивности на 0-9%). Ответы на сильные воздействия у ослабленных и больных рыб были немного меньше, чем у сильных, здоровых особей, однако, как правило, достоверно не отличались. В норме и перед гибелью при хроническом стрессе у рыб наблюдались близкие значения эритроцитарного магния, которые занимали промежуточное положение между теми, что фиксировали при кратковременных слабых и сильных воздействиях. Перед нерестом и во время икрометания у рыб регистрировали самый высокий в году уровень магния в эритроцитах. Минимальное содержание магния в красных кровяных клетках отмечено летом.

Состояние рыб, вызываемое воздействием несильных непродолжительных нагрузок и сопровождающееся усилением анаболизма и повышением устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов, называется физиологическим стрессом (Аршавский, 1982) или активной защитной реакцией (Запруднова, 2012). Из литературных данных (Константинов, 1993 и др.) известно, что при небольших колебаниях абиотических факторов наблюдается усиление роста и развития рыб, которое, в свою очередь, сопровождается снижением потребления кислорода и пищи. Результаты настоящих исследований позволяют рассматривать увеличение концентрации ионов магния в эритроцитах при несильных стрессовых воздействиях как один из механизмов уменьшения интенсивности газообмена, т.е. как один из возможных механизмов повышения анаболизма. Это связано с положительным модулирующим эффектом ионов магния на сродство гемоглобина к кислороду (Запруднова, Камшилов, 2008 и др.). Мощные анаболические процессы у рыб во время размножения наблюдали при высокой концентрации магния в эритроцитах.

Состояние организма, возникающее при действии сильных стрессоров и сопровождающееся усилением катаболических процессов и понижением неспецифической устойчивости организма, определяется как патологический стресс (Аршавский, 1982) или пассивная защитная реакция (Запруднова, 2012). Уменьшение концентрации магния в эритроцитах при сильных стрессовых воздействиях в значительной степени способствует уменьшению сродства гемоглобина к кислороду и, таким образом, увеличению газообмена и, как следствие, повышению катаболизма. В летний период года, когда рыбы высокоподвижны и потребляют много кислорода, у них отмечен низкий уровень магния в эритроцитах.

Главное значение ионов магния в гемоглобиновой системе, вероятно, определяется их способностью (как антагонистов отрицательного модулятора АТФ) повышать сродство гемоглобина к кислороду. На основании проведенных исследований ионы магния в эритроцитах предлагается рассматривать как один из молекулярных механизмов, регулирующих процессы газообмена, анаболизма и катаболизма рыб и, в конечном итоге, их роста и развития.

Натрий. При действии сильных стрессоров концентрация адреналина и норадреналина во внутренней среде рыб увеличивается в среднем в 100 раз. При этом доминировал тот гормон, который преобладал в хромоаффинной ткани: у леща, например, норадреналин. Под влиянием слабых непродолжительных воздействий в крови увеличивался уровень только адреналина – конечного продукта синтеза гормонов. Под действием как эндогенных, так и экзогенных гормонов концентрация натрия в эритроцитах увеличивалась в 1.5-2 раза и более. Наиболее низкие значения концентрации натрия в эритроцитах (в 1.3-1.6 ниже нормы) регистрировали у рыб при значительном истощении запасов гормонов в хромоаффинной ткани (головной и туловищной почках). Концентрация натрия в эритроцитах заметно увеличивается у рыб в высоких температурах. В нерестовый период концентрация натрия в эритроцитах достигает наибольших в году значений.

По концентрации натрия в эритроцитах рыб можно также судить об интенсивности Na^+/H^+ обмена через мембрану эритроцитов, т.е. о буферных свойствах организма. Наиболее

сильно защелачивается внутриэритроцитарная среда у наиболее кислотоустойчивых рыб (щуки и окуня), а у наименее кислотоустойчивых (осетровых) – этот показатель минимален. У остальных видов рыб, относящихся к среднеустойчивым к закислению среды (карповые, налим и др.), концентрация натрия в эритроцитах занимает промежуточное положение между указанными выше видами рыб. Ранее нами (Запруднова, Камшилов, 2008) установлена обратная зависимость между концентрацией натрия в эритроцитах и эффектом Бора. Эта связь основана на важнейшем механизме регуляции кислотно-щелочного равновесия микроокружения гемоглобина путем Na^+/H^+ обмена через мембрану эритроцитов. С увеличением концентрации натрия в красных кровяных клетках повышается величина рН и, таким образом, уменьшается возможность для реализации эффекта Бора (т.е. понижения сродства гемоглобина к кислороду с понижением рН). И, напротив, с уменьшением эритроцитарного натрия и, следовательно, рН создаются условия для проявления эффекта Бора. Вероятно, основная роль ионов натрия в гемоглобиновой системе состоит в обеспечении величины рН внутриэритроцитарной среды, оптимальной для работы гемоглобина.

Калий. В условиях несильной непродолжительной нагрузки (при физиологическом стрессе) концентрация калия в эритроцитах рыб снижалась в 1.5 раза от исходного значения. Под влияние сильных стрессоров, как правило, уровень эритроцитарного калия увеличивался. Уменьшение содержания кислорода в воде всегда сопровождалось повышением концентрации калия в красных кровяных клетках. Так у леща, адаптированного к содержанию кислорода в воде 3-5, 7-9 и 12-14 мг/л, концентрация калия в эритроцитах составляла, соответственно, 99-110, 87-96, 60-74 ммоль/л. Выдерживание рыб на воздухе также вызывало увеличение уровня калия в эритроцитах: в 1.1-1.3 раза. Концентрация калия в красных кровяных клетках холодолюбивого налима летом (когда он малоактивен и испытывает дефицит кислорода) в 1,6 раз выше, чем осенью. У щуки по причине большой площади жаберных клеток для обмена газами в период активности наблюдается гипероксия крови, которая сопровождается снижением содержания калия в эритроцитах в 1.5 раза в сравнении со спокойным состоянием. Вероятно, главное назначение ионов калия в гемоглобиновой системе состоит в создании оптимальных условий для функционирования гемоглобина при конкретном напряжении кислорода в крови.

Кальций. Концентрация кальция в эритроцитах рыб крайне низка: в 30-300 раз ниже уровней трех других исследуемых катионов. При стрессе, вызываемом как сильными, так и слабыми стрессорами (т.е. в условиях патологического и физиологического стресса) наблюдали уменьшение уровня этого иона в красных кровяных клетках. Однако в первом случае отклонения выражены слабее, но более продолжительны. Перед нерестом и во время икрометания у рыб регистрировали самый низкий в году уровень кальция в эритроцитах. Уменьшение концентрации кальция в красных кровяных клетках, вероятно, следует рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на стабилизацию цитоскелета. Общеизвестно (начиная с ранних работ Г.Селье) о явлениях кальцифилаксии при стрессе. Противоположные явления в эритроцитах при стрессе и нересте могут служить еще одним доказательством особой значимости этих клеток для организма, вероятно, главным образом, в связи с дыхательной функцией.

Эритроцитарные катионы магния, натрия, калия и кальция обладают одновременно двумя различными свойствами: высокой чувствительностью и высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов. В ответ на действие сильных стрессоров изменения концентрации ионов в эритроцитах происходят практически мгновенно в пределах 10-50% (когда в других тканях еще нет отклонений в содержании ионов) и сохраняются практически на этих же уровнях (изменения 0-11%) при усилении неблагоприятного фактора до момента гибели рыб (когда отклонения ионного состава других тканей, включая такие важные как внутренняя среда и мозг, достигают максимальных значений: 50-300% и более). Особенности поведения эритроцитарных ионов связываются с дыхательной функцией.

Концентрация калия в эритроцитах в норме в 30 и более раз выше уровня этих ионов в плазме крови. Перед гибелью содержание калия в эритроцитах при сильном остром стрессе сохраняется на нормальном уровне или несколько превышает его, увеличивая таким образом концентрационный градиент по этому иону между плазмой крови и эритроцитами. Вероятно, поддержание высокого уровня калия в эритроцитах обеспечивается снижением проницаемости мембраны для ионов, в значительной мере связанной с уменьшением концентрации кальция в

красных кровяных клетках. Активный транспорт ионов калия из плазмы в эритроциты перед гибелью рыб, как установлено нами, равен нулю.

Отклонение концентрации катионов во внутренней среде организма в сторону снижения ионных градиентов на мембране клеток и тканей служит показателем неблагополучия в связи с важной энергетической ролью ионных градиентов. По этой же причине показателями неблагополучия служит усиление потери ионов из организма в воду и ослабление активного транспорта (Запруднова, 2012). Однако концентрация катионов в эритроцитах не может служить безусловным показателем (не)благополучия организма, т.к. перед гибелью может значительно различаться по величине (натрий, магний, калий), может изменяться в различном направлении при ухудшении состояния организма (калий, натрий), и, напротив, уменьшаться как при физиологическом, так и патологическом стрессе (кальций). Однако концентрация эритроцитарных катионов может отражать состояние отдельных физиологических процессов, как правило, связанных с дыхательной функцией. По концентрации магния в эритроцитах можно определять характер (направленность) и интенсивность метаболических процессов. Высокая концентрация магния в красных кровяных клетках (в 1.5-2 раза и более выше нормы) характерна для сильных, здоровых рыб в период усиления анаболизма (при экспериментальном физиологическом стрессе и во время размножения), а крайне низкие значения эритроцитарного магния наблюдаются при усилении катаболизма (во время сильного острого патологического стресса). Концентрация калия в эритроцитах может служить показателем уровня насыщения организма кислородом, т.к. она связана обратной зависимостью с содержанием кислорода в крови рыб и воде. По эритроцитарному натрию можно судить об уровне катехоламинов в крови и хромаффинной ткани, т.к. существует связь между концентрацией натрия в красных кровяных клетках и содержанием гормонов в организме. По концентрации натрия в эритроцитах можно также определять буферный резерв организма и буферные механизмы идиоадаптации рыб к закислению воды на уровне эритроцитарного Na^+/H^+ обмена. По концентрации кальция в эритроцитах, вероятно, можно судить о процессах в клетке и на клеточной мембране, контролируемых этими ионами.

В связи с тем, что прижизненные концентрации ионов в эритроцитах у рыб не могут служить безусловным показателем их благополучия нами разработан простой и информативный экспресс-метод определения состояния рыб по интенсивности активного транспорта ионов калия в эритроциты в опытах *in vitro*. Об активном транспорте судили по уменьшению концентрации калия в плазме при инкубации крови. Этот процесс ингибировался оубаином и низкими температурами. Интенсивность активного транспорта снижалась при ухудшении состояния рыб, вызываемом разными причинами, и достигала нулевых значений перед гибелью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. М: Наука, 1982. 270с.
2. Запруднова Р.А. Обмен и регуляция катионов у пресноводных рыб в нормальных и экстремальных условиях // Настоящий сборник, 2012.
3. Запруднова Р.А., Камшилов И.М. Межвидовые различия дыхательных функций эритроцитов некоторых пресноводных рыб // Вопросы ихтиол. 2008. Т.48. № 4. С. 553–562.
4. Константинов А.С. Влияние колебаний температуры на рост, энергетику и физиологическое состояние молоди рыб // Извест. АН РАН. Сер. биол. 1993. № 1. С. 55-63.
5. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568с.

ERYTHROCYTE CATIONS IN THE ADAPTATION PROCESS IN FISH

R.A. Zaprudnova

The concentration of magnesium, sodium, potassium and calcium ions in erythrocytes of fresh-water fish in normal conditions, under stress and annual cycle are investigated. It is found that erythrocyte cations are mainly associated with respiratory function of red blood cells.

ЭНДОГЕННЫЕ РИТМЫ УДЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ *LYMNAEA STAGNALIS* (GASTROPODA, LYMNAEIDAE) КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ

А.А. Зотин, С.Ю. Клейменов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

e-mail: aazotin@mail.ru

Рост, как и большинство процессов, происходящих в онтогенезе, сопровождается определенными ритмами. По мнению ряда авторов (Мина, Клевезаль, 1976; Бродский, Нечаева, 1988 и др.) подобные ритмы составляют основу жизнедеятельности организмов, являясь, скорее, правилом, чем исключением, и, по-видимому, тесно связаны с механизмами регуляции биологических процессов посредством изменения длительности периодов и амплитуды колебаний.

Все периодические изменения, происходящие в организме животных, можно разделить на 2 типа:

1. Процессы, связанные с периодическими изменениями факторов внешней среды (экзогенные, непосредственно вызванные факторами среды, и эндогенные, период которых совпадает с периодом колебаний условий среды).

2. Эндогенные периодические процессы, не связанные с изменением внешней среды.

К процессам первого типа относятся, в первую очередь, околосуточные (циркадные) колебания и сезонные (цирканнуальные) изменения, имеющие период около 1 года. Существует обширная литература, посвященная околосуточным и сезонным колебательным процессам, связанных с ростом у представителей практически всех таксонов животных (Мина, Клевезаль, 1976).

Процессы второго типа изучены довольно слабо. Наиболее известны эндогенные ритмы роста, связанные с линьками у членистоногих и ряда других животных (Мина, Клевезаль, 1976; Клейменов, 1997).

У млекопитающих и некоторых других позвоночных были обнаружены эндогенные ритмы роста с периодом около 2 нед (Корей, 1937; Федоров, 1973; Сипачев, 1970).

Разработанные к настоящему времени программные средства позволяют разделить общую зависимость, полученную в эксперименте, на несколько слагаемых (Данилов, Жиглявский, 1997):

1. Основной тренд - общее направление изменения исследуемого параметра.

2. Одна или несколько волновых компонент, связанных с закономерным изменением параметра.

3. "Шумовая" компонента, связанная со случайными вариациями, вызванными неточностью измерений, флуктуациями и т.п.

Каждая из этих компонент может быть проанализирована отдельно.

Данная работа посвящена анализу эндогенных биоритмов удельной скорости роста в постэмбриональном онтогенезе *L. stagnalis*. Особое внимание уделено связи наблюдаемых волновых явлений с процессом онтогенетической адаптации моллюсков к изменившимся после вылупления условиям среды обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моллюсков *L. stagnalis* L. (Gastropoda, Lymnaeidae) получали путем разведения в лабораторных условиях. Вылупившихся особей содержали в отстоянной (не менее 2 сут.) водопроводной воде при постоянной температуре 18°C, поодиночке, в пластиковых стаканах объемом 500 мл. Воду и корм меняли 2 раза в нед. Кормом служила белокочанная капуста *Brassica oleracea* L.

Измерения проводили 2 раза в нед, начиная с момента вылупления до возраста 10 нед, а затем 1 раз в 1–2 нед вплоть до естественной гибели животных.

Общую массу тела моллюсков измеряли на торсионных весах с точностью 1 мг, если ее значение не превышало 250 мг, или на технических весах с точностью 10 мг у животных

большого размера.

Удельную скорость роста рассчитывали с помощью программы Matlab (версия 7.3.0.267, разработана компанией The MathWorks, Inc, США). Одновременно проводили сглаживание полученных данных с помощью кубических сплайнов и построение временного ряда удельной скорости роста.

Полученные данные анализировали методом сингулярного спектрального анализа с помощью программы "Гусеница" (версия 3.40, разработана компанией GistaT Group, Россия) (Данилов, Жигляевский, 1997). При применении программы были выбраны следующие параметры: длительность шага по временной шкале - 1 нед; длина окна (длина "гусеницы") - 18 шагов; без центрирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На ранних этапах после вылупления удельная скорость роста в среднем остается неизменной и колеблется вокруг значения 10 год^{-1} с периодом около 2 нед и амплитудой около 3.3 год^{-1} . Постоянство удельной скорости роста свидетельствует об экспоненциальном характере роста в этот период. Приблизительно на 8-9 нед постэмбрионального развития происходит резкое увеличение удельной скорости роста и к 10-12 нед достигается глобальный максимум ($58.4 \pm 6.4 \text{ год}^{-1}$). Затем наблюдается тенденция к непрерывному снижению удельной скорости роста вплоть до гибели моллюсков.

Постоянное снижение удельной скорости роста характерно для взрослых животных (Зотин, 2009). Поэтому можно считать, что срок достижения максимального уровня этого параметра соответствует окончанию периода адаптации моллюсков к изменившимся после выхода из оболочек условиям среды обитания.

Анализ временного ряда удельной скорости роста показал, что начиная с 12 нед после вылупления, изменение этого параметра в наибольшей степени связано с основным трендом ($83.4 \pm 2.0\%$).

Закономерные периодические изменения представлены двумя биоритмами.

1. Биоритм со средним периодом 10.3 ± 0.3 нед, $n = 61$ (вклад этого биоритма в изменчивость удельной скорости роста - $12.4 \pm 1.6\%$).

2. Биоритм со средним периодом 6.5 ± 0.1 нед, $n = 108$ (вклад в изменчивость удельной скорости роста - $3.3 \pm 0.7\%$).

Наблюдаемый на ранних этапах 2-недельный биоритм после 12 нед развития перестает выявляться. Вероятно, это связано со слишком большими интервалами между измерениями.

Наименьший вклад в изменчивость удельной скорости роста вносит "шумовая" составляющая - $0.8 \pm 0.2\%$. Столь малая величина связана с тем, что основная часть стохастического шума была убрана на предварительном этапе подготовки временного ряда при сглаживании экспериментальных данных кубическим сплайном.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы:

1. Для обоих биоритмов колебания у разных особей происходят синхронно, т.е. локальные максимумы приходятся приблизительно на одни и те же возраста.

2. Периоды обоих биоритмов в онтогенезе одной и той же особи после достижения возраста 12 нед (возраст окончания адаптации к новым условиям среды) остаются приблизительно постоянными.

3. Биоритм с периодом 10.3 нед является затухающим. Его амплитуда постоянно уменьшается от значения $3.17 \pm 0.43 \text{ год}^{-1}$ ($n = 14$) в возрасте 10 нед до $0.78 \pm 0.30 \text{ год}^{-1}$ ($n = 14$) к моменту гибели.

4. Биоритм с периодом 6.5 нед - не затухающий со средней амплитудой, имеющей у разных особей приблизительно одинаковое значение $0.75 \pm 0.06 \text{ год}^{-1}$ ($n = 115$). Независимость амплитуды этого биоритма от возраста животных подтверждается дисперсионным анализом.

Эти выводы, а также тот факт, что во внешней среде не наблюдается колебательных явлений с периодами 6.5 и 10.3 нед, свидетельствуют, по нашему мнению, об эндогенном характере выявленных биоритмов.

Мы полагаем, что колебания удельной скорости роста и интенсивности потребления кислорода могут получить наиболее адекватное объяснение с позиций термодинамики необратимых процессов, которая рассматривает организмы животных как диссипативные

структуры определенного уровня неравновесности. В стабильном состоянии термодинамические потоки и силы в таких системах не остаются строго постоянными, а колеблются вокруг некоторой величины (Prigogine, 1972). Кроме того, наличие двух ритмов - затухающего и не затухающего находится в полном соответствии с выводами термодинамики нелинейных процессов (Малек-Мансур и др., 1980).

Биологическое значение биоритмов для функционирования живых систем, по мнению многих авторов, связано с возможностью на их основе осуществлять регуляцию биологических процессов (Мина, Клевезаль, 1976; Бродский, Нечаева, 1988 и др.).

Можно предположить, что биоритмы роста тесно связаны с адаптацией животных к новым условиям среды обитания. Об этом, в частности, свидетельствует то, что в раннем постэмбриональном онтогенезе выживают моллюски, глобальный максимум удельной скорости которых приходится на 10-12 нед. Этот возраст совпадает с возрастом достижения абсолютного максимума при интерференции волн с наблюдаемыми периодами 2.0, 6.5 и 10.3 нед.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-00397-а) и Президиума РАН (программы "Живая природа: современное состояние и проблемы развития" и "Организация научных экспедиций и содержание научных стационаров").

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Бродский В.Я., Нечаева Н.В. Ритмы синтеза белка. М.: "Наука", 1988. 239 с.
2. Данилов Д.П., Жиглявский А.А. (ред.) Главные компоненты временных рядов: метод "Гусеница". СПб: Санкт-Петербургский университет, 1997. 308 с.
3. Зотин А.А. Закономерности роста и энергетического обмена в онтогенезе моллюсков: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: ИБР РАН, 2009. 30 С.
4. Клейменов С.Ю. Энергетический обмен растущих личинок сверчка *Acheta domestica* L. по данным непрямой и прямой калориметрии // ДАН РАН. 1997. Т. 353. № 5. С. 690-692.
5. Малек-Мансур М., Николис Г., Пригожин И. Неравновесные фазовые переходы в химических системах // Термодинамика и кинетика биологических процессов. М.: "Наука", 1980. С. 59-83.
6. Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: "Наука", 1976. 291 с.
7. Сипачев С.Г. Ритмичность роста животных. Тюмень: 1970. 351 с.
8. Федоров В.И. Рост, развитие и продуктивность животных. М.: "Колос", 1973. 271 с.
9. Корець S. Studia nad przebiegiem i natura normalnych wahań w ciężarze ciała myszy. I. Obras dimorfizmu płciowego w przebiegu wahan // Spraw. Pos. Tow. Nauk. Warsz. Wydz. IV. Biol. 1937. V 30. P. 222-238.
10. Prigogine I. La thermodynamique de la vie // La Recherche. 1972. T.3. N 24. P. 547-562.

ENDOGENOUS RHYTHMS OF MASS SPECIFIC GROWTH RATE IN INDIVIDUAL DEVELOPMENT OF *LYMNAEA STAGNALIS* (GASTROPODA, LYMNAEIDAE) AS A POSSIBLE MECHANISM OF ONTOGENETIC ADAPTATION

A. A. Zotin, S. Ju. Kleimenov

We obtained data on changes in total body weight during individual post-embryonic development of 14 specimens of *Lymnaea stagnalis*. Based on these data, values of mass specific growth rate were calculated. The wave components of dependence of the mass specific growth rate on age were studied using singular spectrum analysis. It is shown that within the first 10 weeks mass specific growth rate on average remains unchanged. It sharply increases from 10 weeks old up to 12 weeks old, and then permanently decline. The main trend is accompanied by wave processes. The 2-week biorhythm is found in the early stages of development. At later stages (after 12 weeks of development) two biorhythms with periods of 6.5 and 10.3 weeks are identified. Last two biorhythms are synchronous in different specimens, i.e. local maxima occur at approximately the same age. Periods of both biorhythms remain relatively constant during individual development. Biorhythm with a period of 10.3 weeks is fading. Its amplitude decrease continuously from $3.17 \pm 0.43 \text{ year}^{-1}$ at 10 weeks old to $0.78 \pm 0.30 \text{ year}^{-1}$ at the moment of death. Biorhythm with a period of 6.5 weeks is not fading. Its period is $0.75 \pm 0.06 \text{ year}^{-1}$ independently of concrete specimen and its age. These findings, as well as the fact that there are not oscillatory phenomena with such periods in the environment, allow us to conclude about the endogenous nature of the biorhythms. We also assume that the biorhythms of growth are closely linked with the mechanism of ontogenetic adaptation of animals to new environmental conditions after hatching.

ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НАЛИМА, НЕ ЗАРАЖЕННОГО И ЗАРАЖЕННОГО ЦЕСТОДОЙ *EUBOTHRIMUM RUGOSUM*

Г.И. Извекова *, М.М. Соловьев **, Е.Н. Кашинская **

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

**Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: izvekov@ibiw.yaroslavl.ru

Налим – представитель семейства Gadidae, доминирующее число видов которого обитают в соленой воде при низких температурах. Налим подвергается относительно большим изменениям температуры окружающей среды, чем его морские предки и адаптировался к пресной воде и температурному режиму (Hardewig et al., 2004). В частности, в условиях Рыбинского водохранилища налим нерестится и наиболее активно питается в январе–феврале (Уголев, Кузьмина, 1993). По типу питания налим – ихтиофаг–факультативный бентофаг. В Рыбинском водохранилище налим часто заражен крупной цестодой *Eubothrium rugosum*, в некоторые годы экстенсивность инвазии достигает 100%. Кроме того налим часто конкурирует за пищевые ресурсы с более ценными видами рыб.

Интерес к исследованию червей рода *Eubothrium* и, в частности, их влияния на организм хозяина определяется тем, что многие из них паразитируют в кишечнике лососевых рыб, таких как атлантический лосось *Salmo salar* (Saksvik et al., 2001), радужная форель *Oncorhynchus mykiss*, нерка *Oncorhynchus nerca* (Bosi et al., 2005). Инфекция рыб цестодами рода *Eubothrium* обычно не вызывает серьезной патологии у хозяина, поскольку выживание последнего важно для завершения жизненного цикла паразита. Однако установлено, что рыбы, инфицированные *Eubothrium* sp. имеют более низкую скорость роста, чем неинфицированные и разница эта со временем увеличивается. Не отмечено корреляции между количеством червей и весом рыбы, что свидетельствует об изменении скорости роста лосося даже при низкой интенсивности инвазии (Saksvik et al., 2001). Популяция *E. rugosum*, обитающая в кишечнике налима, представлена червями, находящимися на разных стадиях полового развития и созревания. Значительная часть червей способна после частичной дестробилизации регенерировать и вновь формировать инвазионные яйца. Головной конец червей прикрепляется в пилорических придатках кишечника налима, а стробила выходит в его среднюю часть. Данные по влиянию заражения *E. rugosum* на активность пищеварительных ферментов хозяина – налима отсутствуют.

Цель работы – изучить распределение активности различных пищеварительных ферментов вдоль кишечника налима и установить влияет ли заражение цестодами на уровни активности этих ферментов.

Объектом исследования служил налим *Lota lota*, отловленный в Рыбинском водохранилище. Определены значения рН в желудке, пилорических придатках, переднем, среднем и заднем отделах кишечника налима. Для определения ферментативной активности кишечника делили на 6 отделов (I отдел – пилорические придатки, II–VI – следующие отделы по 4–5 см длиной). В гомогенатах слизистой из отрезков кишечника определяли общую активность протеиназ (активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.1–3.4.13.11), активность амилазы (КФ 3.2.1.1), липазы (неспецифические липазы КФ 3.1.1) и эстераз (неспецифические эстеразы КФ 3.1.1) как описано ранее (Извекова и др., 2011).

В специальной серии экспериментов исследовали активность пищеварительных ферментов у налимов, зараженных цестодой *Eubothrium rugosum*. У зараженных рыб определяли массу червей. По степени зараженности *E. rugosum* налимы были разделены на 3 группы: I – незараженные, II – слабо зараженные с массой червей 0.44–0.8 г, III – сильно зараженные с массой червей 1.06–2.85 г. В этой серии экспериментов делили кишечник на 4 отдела (1-ый отдел – пилорические придатки, 2-ой–4-ый отделы – отрезки кишечника по 3–4 см длиной) и определяли активность гликозидаз (суммарная активность α -амилазы, КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20) и общую протеолитическую активность как описано ранее (Извекова et al., 1997).

Установлено, что значение рН от желудка к пилорическим придаткам достоверно ($p < 0.05$) увеличивается от 5.08 ± 0.43 до 7.14 ± 0.12 . В переднем отделе кишечника значение рН достоверно выше, чем в пилорических придатках, а к заднему отделу достоверно понижается.

Установлено, что в желудке налима протеолитические ферменты активны как при значении рН среды 3, так и при значении 6. Однако, при рН 3 активность протеиназ почти в 4 раза выше, чем при рН 6 (0.395 ± 0.045 и 0.099 ± 0.015 усл.ед./ мг белка соответственно).

От пилорических придатков ко II-му отделу кишечника активность протеолитических ферментов достоверно ($p < 0.05$) возрастает и вдоль всего кишечника остается примерно на одном уровне. Не обнаружен градиент распределения активности амилазы. В пилорических придатках отмечена более высокая активность липаз и эстераз, чем в следующих отделах ($p < 0.05$). Во II-ом – VI-ом отделах активность этих ферментов остается на одном уровне. При исследовании активности эстераз отмечено ее увеличение от пилорических придатков к III-му отделу ($p < 0.05$).

У зараженных рыб II и III групп активность протеаз повышается, а гликозидаз понижается от I-го к 4-ому отделу кишечника ($p < 0.05$). Не отмечено существенных различий в уровнях активности ферментов у рыб II и III групп. Прослеживается некоторая тенденция к зависимости ферментативной активности от степени зараженности: чем сильнее заражение (больше масса гельминтов), тем ниже активность ферментов. Показано, что в большинстве отделов кишечника у незараженных налимов I группы уровни активности исследованных ферментов выше по сравнению с аналогичными показателями у зараженных рыб II и III групп ($p < 0.05$). Заражение цестодами сильнее сказывается на активности протеолитических ферментов кишечника налима. Так, в зависимости от отдела кишечника у незараженных рыб по сравнению с зараженными рыбами III группы активность протеиназ в 1.4–3.8 раза, а II группы – в 1.6–3.2 раза выше. В тоже время активность гликозидаз у незараженных налимов только 1.2–2.4 раза выше, чем в кишечнике у рыб III группы и в 1.1–1.8 раз выше по сравнению с активностью гликозидаз в кишечниках налимов II группы.

Значения рН в желудке налима, установленные в наших экспериментах, несколько выше, чем у других видов рыб, для которых показаны значения в пределах 2.88–4.25. Значения рН в кишечнике колеблется в пределах, указанных для других видов рыб как 7.3–8.7. Однако величина рН ни в желудке, ни в кишечнике не достигает уровня, оптимального для действия многих пищеварительных ферментов (Сорвачев, 1982). Так в желудке налима протеиназы значительно активней при значении рН 3, в то время как реальные значения рН в этом отделе пищеварительного тракта составляют 5.08 ± 0.43 .

Для наземных позвоночных характерна относительная функциональная специализация различных отделов тонкой кишки. Топография мембранного гидролиза и транспорта существенно меняется в онтогенезе. Кроме того, распределение ферментативных и транспортных активностей вдоль тонкой кишки связано с приспособлением ее отделов к различным нагрузкам (изменение состава пищи, скорости движения химуса и т.п.). У рыб основные пищеварительные ферменты проявляют активность на всем протяжении пищеварительного тракта (Уголев, Кузьмина, 1993; Deguaga et al., 2003 и др.). В наших экспериментах активность протеиназ, амилазы, липаз и эстераз также обнаруживалась на всем протяжении кишечника налима.

Функциональная топография кишечника у рыб, даже в пределах достаточно однородной группы, может существенно изменяться, вплоть до смены характера градиента на противоположный. Благодаря своей исключительной пластичности, ферментативный аппарат слизистой кишечника выполняет немаловажную роль в эффективном питании рыб (Уголев, Кузьмина, 1993).

Противоречия в данных различных авторов о распределении активности пищеварительных ферментов в кишечниках рыб могут быть обусловлены различными причинами: типом питания рыб, их образом жизни, сезоном года, возрастом, произвольным делением кишечника на отделы, различием состава пищи, физиологическим состоянием исследуемых рыб, различиями в методах определения ферментативной активности и другими, трудно учитываемыми факторами. Кроме того показано, что характер градиента в значительной степени зависит от способа выражения ферментативной активности (расчет на единицу массы слизистой, единицу длины или площади кишечника) (Уголев, Кузьмина, 1993), что подтверждают полученные нами данные.

Снижение активности исследованных ферментов у зараженного цестодами налима может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых – адсорбцией части ферментов на

тегументе цестод. Во-вторых, – частичным их ингибированием на поверхности цестод, что рассматривается как один из механизмов защиты гельминтов от воздействия протеиназ хозяев. Кроме того, показано, что заражение *E. crassum* радужной форели вызывает значительную редукцию в количестве бомбезина (Bosi et al., 2005). Известно, что бомбезин в желудочно-кишечном тракте стимулирует выброс гастрина, секрецию в поджелудочной железе и двигательную активность кишечника. Возможно, редукция количества бомбезина – еще одна причина снижения ферментативной активности у зараженных рыб, поскольку большинство протеиназ и гликозидаз имеют панкреатическое происхождение (Уголев, Кузьмина, 1993).

Полученные нами результаты согласуются со сведениями о снижении активности амилазы, протеазы и кислой фосфатазы в слизистой и содержимом кишечника сеголетков карпа при заражении *Bothriocephalus acheilognathi* (Куровская, 1991). Установленное снижение активности исследованных ферментов в кишечнике зараженного *E. rugosum* налима также согласуется с полученными нами ранее данными по влиянию заражения *Caryophyllaeus laticeps* на активность пищеварительных ферментов их хозяина – леща (Извекова и др., 2011).

Со снижением активности пищеварительных ферментов может быть связано снижение скорости роста зараженных рыб, отмеченное рядом авторов (Saksvik et al., 2001; Bosi et al., 2005). Это предположение подтверждается также тем фактом, что снижение указанных показателей происходит даже при низкой интенсивности инвазии.

Заражение налима цестодой *Eubothrium rugosum* заметнее влияет на активность протеолитических ферментов. Об этом свидетельствуют как абсолютные значения активности исследованных ферментов, так и вычисленный коэффициент Г/П (отношение активности гликозидаз к активности протеиназ). Увеличение коэффициента Г/П у налимов II и III групп подтверждает, что заражение червями сказывается на соотношении уровней активности протеаз и гликозидаз в сторону уменьшения доли протеиназ. В месте прикрепления червей – пилорических придатках – величина коэффициента Г/П у зараженных рыб больше единицы, что указывает на более значительное влияние заражения в этом отделе кишечного тракта на ферменты, ответственные за гидролиз белковых компонентов пищи.

Сведения о влиянии цестод рода *Eubothrium* на питание хозяина достаточно противоречивы. Так, некоторые авторы считают, что цестоды, паразитирующие в кишечнике рыб, не влияют на хозяина, если потребности в пище удовлетворены, а кроме того, зараженные хозяева компенсируют негативное воздействие паразитов увеличением пищевой активности (Bosi et al., 2005). Не найдено доказательств неблагоприятного действия *E. crassum* и *Proteocephalus* sp. на поглощение питательных веществ у радужной форели *Oncorhynchus mykiss*. Однако, заражение *E. salvelini* серьезно сказывается на молоди нерки *Oncorhynchus nerca*, в том числе на скорости ее роста, выживании и плавательной способности (Boyce, Clarke, 1983). Авторы предполагают, что другие виды *Eubothrium* могут сходно влиять на своих хозяев, но механизмы этих влияний не известны.

Таким образом, выявлен неравномерный характер распределения активности пищеварительных ферментов вдоль кишечного тракта налима. Установлено, что при заражении цестодами *E. rugosum* активность протеиназ и гликозидаз кишечника налима снижается. Заражение заметнее сказывается на активности протеолитических ферментов. Снижение активности пищеварительных ферментов хозяина отмечено даже при низкой степени инвазии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 10-04-00204-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Извекова Г.И., Соловьев М.М., Извеков Е.И. Влияние *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae) на активность пищеварительных ферментов леща // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 1. С. 61–67.
2. Куровская Л.Я. Сопряженность процессов пищеварения в системе *Bothriocephalus acheilognathi* – карп // Паразитология. 1991. Вып. 25. № 5. С. 441–449.
3. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. М.: Легкая и пищевая пром.-сть, 1982. 247 с.
4. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. С-Пб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
5. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum*

- (Cestoda) / Bosi G., Shinn A.P., Giari L., et all. // J. Fish Diseases. 2005. V. 28. P. 703–711.
6. Boyce N.P., Clarke W.C. Eubothrium salvelini (Cestoda: Pseudophyllidea) impairs seawater adaptation of migrant sockeye salmon yearlings (*Oncorhynchus nerka*) from Babine lake, British Columbia // Can. J. Fisheries and Aquatic Sciences. 1983. V. 40. P. 821–824.
 7. Deguara S., Jauncey K., Agius C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream // J. Fish Biol. 2003. V. 62. P. 1033–1043.
 8. Hardewig I., Pörtner H.O., van Dijk P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? // J. Comp. Physiol. B. 2004. V. 174. P. 149–156.
 9. Izvekova G.I., Kuperman B.I., Kuz'mina V.V. Digestion and digestive-transport surfaces in cestodes and their fish hosts // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V. 118A, № 4. P. 1165–1171.
 10. Effect of marine Eubothrium sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L./ Saksvik M., Nilsen F., Nylund A., Berland B. // J. Fish Diseases. 2001. V. 24. P. 111–119.

PECULIARITIES OF DIGESTIVE ENZYMES ACTIVITY IN THE BURBOT NON-INFECTED AND INFECTED BY CESTODES EUBOTHRIUM RUGOSUM

G. I. Izvekova, M.M. Solovyev, E.N. Kashinskaya

A non-uniform distribution was found in the activity of the major digestive hydrolases from the anterior to the posterior section of the burbot's intestine. In the burbot infected by cestodes Eubothrium rugosum, the activities of intestinal proteinases and glycosidases decreased. The invasion had a greater effect on the activity of proteolytic enzymes. The activity of the host digestive enzymes decreased even at a low invasion rate.

ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ ПРИ УЧЕТЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ–ОБЪЕКТОВ

Т.Ф.Казанцева, Г.А.Петухова

ФГБОУ ВПО Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия
e-mail: tanja585@mail.ru

Разливы нефти, ведут к нарушению экологического равновесия, принося несомненный урон природным экосистемам. Нефтяные компоненты при поступлении в поверхностные воды находятся в различных формах (масляная, растворенная, эмульгированная, адсорбированная) (Воробьев, 2006). Наибольшую опасность для гидробионтов представляют водорастворимые и диспергированные компоненты нефти (Черкашин, 2005). ВРФН у морских растений и животных нарушает функционирование ферментных и белковых систем (Manwell, 1967). Нарушения проявляются при непосредственном действии токсиканта, а также после окончания обработки (эффект последствия) и сохраняются у потомков, полученных от родителей, контактировавших с токсикантом (эффект отдаленного действия).

Целью нашей работы являлось: изучить отделенные последствия загрязнения воды и их модификацию при учете биохимических показателей растений. Исходя из вышеуказанной цели, были поставлены и решены следующие задачи:

- в ходе экспериментов проанализировать морфометрические показатели колоса и стеблей пшеницы;

- выявить возможность модификации действия ВРФН с помощью экстракта дуналиеллы (*Dunaliella Salina*), ПАБК и температуры;

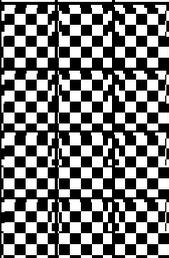
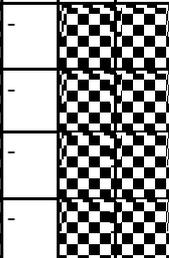
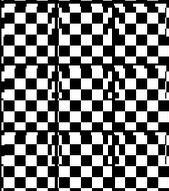
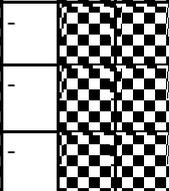
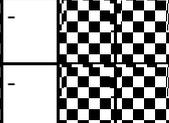
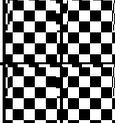
- определить концентрацию пигментов и фенольных соединений в проростках пшеницы.

В качестве модельного тест-объекта использовали пшеницу мягкую (*Tr.aestivum*) сорта «Тюменская – 80» районированную в Тюменской области. В качестве токсиканта для опытов использовали водорастворимую фракцию Шаимской нефти (ВРФН) с Ханты- Мансийского района. В качестве модификаторов использовали температуру (физический фактор), ПАБК (химический фактор) и экстракт дуналиеллы (органический фактор). Эксперименты на пшенице были начаты в 1996 году и продолжаются по сей день. В лабораторном и полевом эксперименте использовали водорастворимую фракцию Шаимской нефти, 0,001% раствор ПАБК. Так же в эксперименте использовали экстракт дуналиеллы плотностью 130 кл/мл. В ходе эксперимента использовали различные варианты опытов (Таблица 1).

Анализ морфометрических показателей вегетативных признаков пшеницы подвергшейся действию ВРФН и прошедшей 9 лет без обработки позволил установить, что ЭОД проявляется по 1 из 6 анализируемых показателей (ширина листа). Использование в качестве агента температуры при воздействии ВРФН и 6 лет без обработки проявляет ЭОД по 1 из 6 анализируемых показателей (высота растения. Анализ морфометрических показателей пшеницы, подвергавшейся воздействию ВРФН при использовании в качестве агента ПАБК и прошедшей 5 лет без обработки выявил проявление ЭОД по показателю длины листа. Данный показатель статистически достоверно выше уровня контроля, что указывает на стимулирующее действие ПАБК. Использование в качестве агента экстракта дуналиеллы при воздействии ВРФН и 2 года без обработки проявляет ЭОД в 2 из 6 анализируемых показателей: снижает значение количества листьев и повышает значение ширины листа.

Анализ морфометрических показателей генеративных признаков пшеницы подвергавшейся действию ВРФН и прошедшей 9 лет без обработки позволил установить, что ЭОД проявляется по 4 из 8 анализируемых в ходе эксперимента показателей (ширина колоса, масса главного колоса, количество и масса зерен с главного колоса). Использование температуры в качестве агента на фоне ВРФН и 6 лет без обработки проявляет ЭОД в увеличении показателя ширины колоса и снижении показателя количества зерен со всего растения. Использование ПАБК в качестве агента на фоне ВРФН и 5 лет без обработки не проявляет ЭОД. Использование в качестве агента экстракта дуналиеллы при воздействии ВРФН и 2 года без обработки проявляет ЭОД в снижении 1 из 8 анализируемых показателей (количество генеративных стеблей).

Таблица 1. Варианты экспериментов

| Вариант эксперимента | Поколения и годы исследования | | | | | | | | | | | | | | | Вид регистрируемого эффекта | |
|----------------------|---|---|----------------|----------------|---|----------------|----------------|----------------|---|----------------|-----------------|-----------------|--|-----------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | P ₀ | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ | F ₅ | F ₆ | F ₇ | F ₈ | F ₉ | F ₁₀ | F ₁₁ | F ₁₂ | F ₁₃ | F ₁₄ | | |
| | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | | |
| Контроль | | | | - | | | | | | | | | | | | Отсутствует | |
| O1 |  |  | | - |  | | | | | | | | | | | ЭОД 5(9) | |
| O2 |  |  | | - |  | | | |  | | | | | | | ЭОД 5(2) + т(6) | Комбинированное действие |
| O3 |  |  | | - |  | | | |  | | | | | | ЭОД 5(3)+ ПАБК(5) | | |
| O4 |  |  | | - |  | | | | | | | |  | | ЭОД 5(6) дуналиелла (2) | | |

Примечание:

-  -воздействие ВРФН
-  -воздействие температуры
-  -воздействие ПАБК
-  -воздействие экстракта дуналиеллы

Изучение проводили не только в полевом, но и в лабораторном эксперименте. Анализ морфометрических показателей вегетативных признаков проростков пшеницы подвергавшейся воздействию ВРФН и прошедшей 9 лет без обработки не выявил проявления ЭОД. Использование в качестве агента температуры при действии ВРФН и 6 лет без обработки проявляет ЭОД в увеличении 2 из 5 анализируемых показателей (ширина проростка, количество корней). Анализируя морфометрические показатели пшеницы, подвергавшейся воздействию ВРФН при использовании в качестве агента ПАБК и прошедшей 5 лет без обработки проявляет ЭОД в увеличении 2 из 5 анализируемых показателей (ширина проростка, количество корней). Использование в качестве агента экстракта дуналиеллы при воздействии ВРФН и 2 года реабилитации проявляет ЭОД по 2 из 5 анализируемых показателей. Показатели ширины проростка и длины корня статистически достоверно выше уровня контроля.

В процессах жизнедеятельности растений большую роль играют фенольные вещества. Фенольные вещества характеризуются многообразием биологической активности. Они регулируют прорастание семян, рост и развитие растений, окраску цветков и плодов, участвуют в репродукции, выполняют защитную роль при повреждении растений (Метлицкий, 1970). Фенольные соединения образуются практически во всех растительных организмах. Характер их накопления видо-, сорто- и органоспецифичен (Яковлева, 2007).

Анализ количества фенольных соединений в полевом эксперименте показал наличие отклонений от контроля во всех опытных вариантах. Все показатели по данному признаку статистически достоверно ниже уровня контроля, т. е. наблюдается проявление ЭОД.

При анализе эффективности действия агентов в опытах с комбинированным действием ВРФН + агент, выявлено, что наибольшей эффективностью обладает температура, так как, опыт О2 имеет наибольший показатель концентрации фенольных веществ, по сравнению с О3 и О4.

Анализ количества фенольных соединений в проростках показал наличие отклонений от контроля во всех опытных вариантах, т. е. ЭОД есть. При сравнении опытов ВРФН + агент с опытом 5-и кратного воздействия ВРФН отмечается повышение показателя, в опытах с комбинированным действием ВРФН + агент. Это связано с тем, что агенты активируют систему защиты растения. Наиболее эффективным из использованных модификаторов является температура, т. к. показатели в О2 и статистически достоверно выше уровня контроля. Таким образом, температура включает и усиливает работу системы защиты растения.

Анализ концентраций пигментов фотосинтеза подразумевал исследование концентраций хлорофилла А, хлорофилла В, каротиноидов и общую концентрацию пигментов.

Пигменты играют важную роль в метаболизме растений. Изменение их концентраций ведет к изменению энергетической стабильности растения. Главной функцией пигментов является поглощение света в процессе фотосинтеза. Хлорофилл А – основное функциональное звено фотосинтезирующих систем листа, он поглощает в основном фиолетовые и синие лучи, при этом отражая зеленые. Хлорофилл В – вспомогательный пигмент, который расширяет спектр поглощения света в процессе фотосинтеза. Каротиноиды выполняют в листе ряд функций, главные из которых: участие в поглощении света в качестве дополнительных пигментов, защита молекул фотосинтеза от неблагоприятного окисления. Фотосинтез является одним из наиболее чувствительных процессов к действию чужеродных веществ и напрямую связан с работой систем защиты растений. В процессе восстановления поврежденных затрачиваются огромные энергетические ресурсы, которые непосредственно вырабатываются при фотосинтезе (Полевой, 1989).

Были получены следующие результаты.

Использование ВРФН и 9 лет без обработки статистически достоверно снижает концентрацию хлорофилла А, хлорофилла В, каротиноидов и общую концентрацию пигментов, т. е. проявляется ЭОД. Модификация температурой в О2 статистически достоверно повышает содержание хлорофилла В, каротиноидов и общую концентрацию пигментов. Это говорит о стимулирующем действии температуры на данный признак. Модификация ПАБК статистически достоверно повышает содержание хлорофилла В, каротиноидов и общую концентрацию пигментов. Модификация дуналиеллой в О4 статистически достоверно повышает концентрацию хлорофилла А.

Анализируя пигментный состав проростков пшеницы, было выявлено, что использование ВРФН и 9 лет без обработки статистически достоверно снижает концентрацию хлорофилла А. Модификация температурой статистически достоверно повышает концентрацию хлорофилла А и общую концентрацию пигментов. Модификация ПАБК статистически достоверно повышает концентрации каротиноидов и общей концентрации пигментов. Модификация дуналиеллой статистически достоверно повышает все показатели. Таким образом, полученные результаты указывают на стимулирующее действие агентов на данные показатели.

ВЫВОДЫ:

1. У пшеницы, подвергавшейся в предшествующих поколениях (F1-F5) действию ВРФН, выявлено проявление ЭОД в F14 поколении при учете морфометрических и биохимических показателей.

2. Использование в качестве модификаторов действия ВРФН температуры, ПАБК и экстракта дуналиеллы как увеличивают степень выраженности различных показателей, так и снижают.

3. Использование температуры более эффективно, по сравнению с ПАБК и экстрактом дуналиеллы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manwell С., Baker С.М.// J.mar.boil/ Ass. U.K.,1967. 659- 667 p.
2. Воробьев Д. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на макрозообентос /Д. С. Воробьев // Известия Томского политехнического университета. 2006. Т. 309. № 3. С. 42-45.
3. Метлицкий Л. В. Место и роль фенольных соединений в явлении фитоиммунитета // Тезисы докладов по фенольным соединениям. Алма-Ата. 1970. С. 104-105.
4. Полевой В.В. Физиология растений: учебное пособие. М.: Высшая школа, 1989. 278 с.
5. Черкашин С. А. Отдельные аспекты влияния углеводородов нефти на рыб и ракообразных / С. А. Черкашин // Вестник ДВО РАН. 2005. № 3. С. 83-91.
6. Яковлева О.А. Динамика роста биомассы и накопления фенольных соединений в каллусной культуре сирени обыкновенной (*syringa vulgaris* (L.)) / О. А. Яковлева, Л. А. Любаковская, В. Н. Решетников, Н. Г. Брель // Вестник ВГМУ. 2007. Т. 6. №3. С. 1-9.

ASSESSMENT OF THE REMOTE CONSEQUENCES OF POLLUTION OF WATER AND THEIR UPDATING AT THE ACCOUNTING OF BIOCHEMICAL INDICATORS MODELLING THE TEST – OBJECTS

T.F.Kazantseva

The analysis of results of morfometric indicators of vegetative and generativny signs, biochemical indicators on modeling test object to wheat soft is carried out. Manifestation of effects of the remote action as in experience with a toksikant, that is revealed and when updating. It is shown that the revealed violations have genetic character and pass from father to son.

О ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ КАРДИОАКТИВНОСТИ МОЛЛЮСКА *LITTORITA LITTOREA* В ЭКОМОНИТОРИНГЕ МОРСКИХ ЛИТОРАЛЕЙ.

Н.Н. Камардин, В.А. Любимцев, С.В. Холодкевич, Г.П. Удалова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский Центр экологической безопасности РАН

E-mail: nik-kamardin@yandex.ru

В настоящее время перспективным направлением в экотоксикологических исследованиях становится применение в качестве биомаркеров показателей кардиоактивности бентосных беспозвоночных с твердым наружным скелетом. Изменения хронотропных характеристик частоты сердечных сокращений (ЧСС) после стандартных, не повреждающих воздействий, выполняющих роль физиологической нагрузки, оказались достаточно информативными для оценки функционального состояния гидробионтов, как в нормальных условиях их существования, так и при действии токсических веществ, в том числе соединений тяжёлых металлов (ТМ) (Styrishave et al. 1995; Холодкевич и др. 2009; Камардин и др. 2009, Камардин и др. 2011).

Известна способность гидробионтов к биоаккумуляции ТМ. Кинетика и степень выраженности этого процесса зависит от многих факторов, в частности от того, участвует ли ТМ в реализации биохимических и физиологических реакций или же он чужероден для организма. Так, Zn, Cu, Fe и Mg входят в состав ферментов и дыхательных пигментов (Wihte, Rainbow,1985). В отличие от этого, нет данных об участии Hg, Cd, Ag в осуществлении физиологических функций (Bryan, 1984). Отсутствие в литературе прямых указаний на связь уровня накопления ТМ в тканях гидробионтов и их кардиоактивностью, стало причиной проведения нами специальных экспериментов. Было показано, что у переднежаберных

моллюсков - литорин (*Littorina littorea*) при хроническом воздействии Cu в концентрации 45,5 мкг/л в морской воде в тканях происходит её аккумуляция (до 67,0 мкг/л на 22 день опыта), сопровождающаяся монотонным повышением ЧСС. Инъекция в мантийную полость моллюска раствора CuSO₄ также вызывала повышение ЧСС (Камардин и др., 2009). Применяв специальный тест (нагрузку) - разбавление на 50% морской воды в аквариуме, обнаружили, что после 3 суток экспозиции литорин в морской воде с раствором CuSO₄ (50,0 мкг/л), биомаркер кардиоактивности - время восстановления ЧСС до первоначального уровня - удлинялось, по сравнению с таковым у животных, находившихся в контрольной морской воде. Этот биомаркер рассматривался как показатель адаптивных возможностей животного (Камардин и др. 2011).

В настоящей работе у литорин исследовались изменения кардиоактивности при хроническом (до 11 суток) воздействии Cd для сравнения с данными для меди, используя указанный выше биомаркер - изменение времени восстановления ЧСС до исходного уровня в ответ на нагрузку (гипоосмотический тест). Эксперименты проводили на 12 моллюсках, собранных на сублиторали Чупинской губы Кандалакшского залива Белого моря. Животные акклиматизировались в лабораторных условиях в искусственной морской воде с соленостью 29‰. при постоянной температуре 9.0±0.3°C. Затем им на раковину приклеивали датчики для записи кардиоактивности и помещали в аквариум (30л), снабженный системами активной циркуляции и биологической очистки воды. Периодически проверяли содержание в воде продуктов азотистого обмена и контролировали соленость, используя рефрактометр TI-SAT28 (Trans Instruments, USA) с автоматической компенсацией температуры измеряемого раствора. Литорин содержали при световом режиме 12C:12T на естественном кормовом режиме.

Кардиоактивность регистрировали неинвазивно с помощью семиканального волоконно-оптического фотоплетизмографа, соединенного через аналого-цифровой преобразователь с компьютером. Специально созданная программа "VarPuls" позволяла проводить в автоматическом режиме математическую обработку ЧСС, а также визуализировать её одновременно у 7 моллюсков и измерять текущую среднюю величину ЧСС в реальном времени. Значения характеристик кардиоактивности обрабатывались статистически с помощью программы Prisma 3.0. Для усреднённых арифметических значений ЧСС (фоновых и после тестирования гипоосмотической морской водой) вычисляли среднее квадратичное отклонение (СКО), строили гистограммы средних величин ЧСС. Определяли достоверность отличия непарных средних по критерию *t*-Стьюдента при $p \leq 0.05$. После стабилизации фоновой ЧСС, проводили двухчасовой тест – разбавление на 50% морской воды, к которой моллюски были адаптированы. Затем солёность воды быстро восстанавливали. Наблюдали при этом изменения кардиоактивности и поведения литорин. Гипоосмотический тест вызывает у литорин, как правило, защитную поведенческую реакцию: втягивание за счёт сокращения мышц-аддукторов тела моллюска в раковину и закрытие её устья (рис. 1). Эта реакция осуществляется в течение 2-3 минут. При постоянно закрытой раковине через 25-30 минут после начала воздействия наблюдается снижение ЧСС. В некоторых случаях при замыкании устья раковины, сердечная активность не выявлялась. Акардия могла вызываться либо сильным тормозным рефлекторным воздействием на сердечную мышцу, либо смещением сердца из области чувствительности сенсора. Обнаружились индивидуальные отличия реакции на гипоосмотический тест, что зависело, очевидно, от функционального состояния моллюсков. Так, некоторые литорины противостояли действию опресненной морской воды до 1.5 часов, не закрывая полностью устья. При этом ЧСС снижалась только на 30-50% по сравнению с исходной величиной, т.е. значительно слабее, чем у литорин, проявивших типичный защитный рефлекс. После быстрого возвращения солёности воды до первоначальной величины ЧСС повышалась до исходного уровня. Время восстановления ЧСС в среднем для группы моллюсков равнялось 6,6±2,0 мин (рис.2). Для изучения эффекта хронического воздействия Cd²⁺ в аквариум добавляли раствор CdCl₂. Суммарная концентрация Cd в аквариуме составляла 100.0 мкг/дм³ (около 20 ПДК в применении к пресной воде). Для литорин это ниже летальной величины, но несколько выше имеющейся в естественных условиях их обитания. После 11 суток воздействия раствором хлористого кадмия, проводили в течение 7 суток отмывку моллюсков в чистой морской воде.

У литорин, находившихся в течение 4-11 дней в воде с раствором CdCl₂ после проведения гипоосмотического теста время восстановления ЧСС возрастало, причём тем значительно, чем

дольше моллюски находились при воздействии хлористого кадмия. Так, экспозиция моллюсков в воде с содержанием кадмия 7-11 суток приводила к достоверному удлинению соответственно в 2-4 раза времени восстановления ЧСС (рис.2). Обнаруженное негативное влияние кадмия на ЧСС литорин, проявившееся в торможении процесса восстановления сердечной активности после гипоосмотического стресса, является, очевидно, следствием нарушения деятельности нервной системы и, в первую очередь, её периферического звена висцерального отдела. На это указывает увеличение числа особей, которые становятся неактивными и не реагируют на тест с понижением солености. Так, через 4 суток экспозиции в воде с хлористым кадмием выявился один такой моллюск, через 7 - два, а в конце опыта – четыре. После недели отмывки от кадмия у двух из этих литорин восстановилась чувствительность и способность адекватно реагировать на гипоосмотический тест. На обратимость нейротоксического эффекта кадмия указывает также возвращение к нормальному уровню времени восстановления ЧСС после гипоосмотического теста на седьмой день отмывки (рис.2).

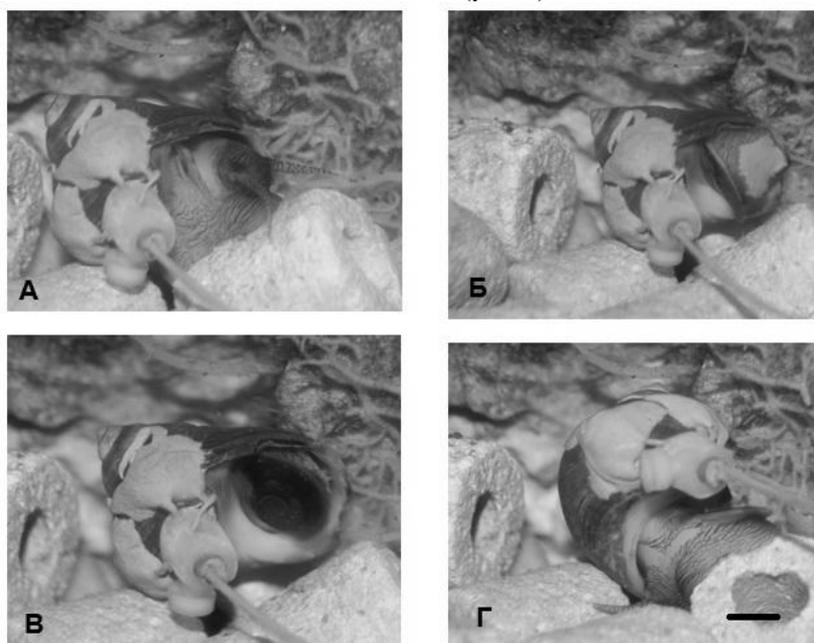


Рис.1. Последовательные стадии (А, Б, В) закрытия и открытия (Г) устья литорины при действии гипосмотического теста. Виден держатель и волоконно-оптический кабель для записи кардиоактивности.

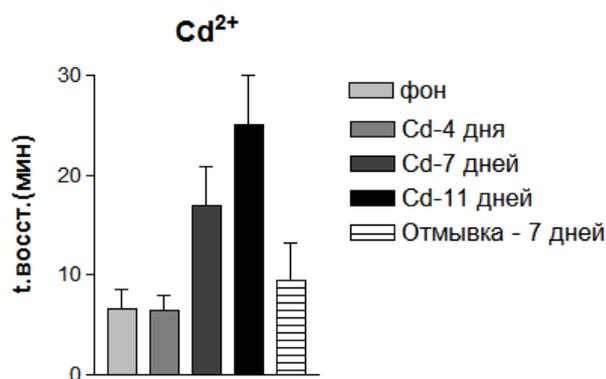


Рис.2. Время восстановления ЧСС (t/восст.) после гипоосмотического теста при проведении его в условиях нахождения моллюсков в исходной морской воде, в воде с раствором хлористого кадмия (в течение 4, 7 и 11 дней), а также после семидневной отмывки в исходной воде. Т – величина СКО.

Для дальнейшего изучения реакции литорин на токсическое воздействие кадмия провели эксперименты с прямой инъекцией в мантийную полость в течение минуты 1,0 мл раствора CdCl_2 в концентрации 100,0 мкг/дм³. В ответ на это раздражение периферических рецепторов обнаружили повышение ЧСС на 3-5 уд/мин, длившееся до 50 минут. В аналогичных условиях контрольная инъекция морской воды не вызвала ни закрытия устья, ни указанных изменений кардиоактивности. Возникновения защитной реакции не наблюдалось и при введении разбавленной на 50% морской воды, однако, при этом в течение около 30 мин снижалась примерно на 20% ЧСС, после чего наблюдалась тенденция к её постепенному восстановлению. Подчеркнём, что, несмотря на небольшое (всего 2-3 уд/мин) снижение ЧСС, направление изменения кардиореакции на инъекцию гипосмотической морской воды совпадало с таковым при реализации полностью сформированной защитной реакции в ответ на разбавление морской воды в аквариуме. Для запуска и проявления комплекса компонентов защитного поведения, очевидно, недостаточно кратковременной осмотической стимуляции рецепторов мантии. Для возникновения генерализованного возбуждения и реализации защитного поведения включающего, включая закрытие устья раковины, изоляцию тела и развитие брадикардии, необходима дополнительная осмо-химическая стимуляция всей поверхности тела моллюска

Обнаруженное у литорин увеличение времени восстановления ЧСС после длительного их пребывания (до 11 дней) в воде с высокой концентрацией кадмия могло быть вызвано возрастанием внутритканевой концентрации ионов этого чужеродного ТМ, а также их непосредственным воздействием на нейроны и синапсы ЦНС. Для такого предположения имеются фактические обоснования, полученные для других ТМ. Так, показано негативное влияние HgCl_2 (10-20 мкМ/л) на электровозбудимые Ca^{2+} входные токи ганглиозных клеток и выходных электровозбудимых K^+ токи сенсорных клеток осфрадия прудовика (Камардин et al., 1999). Удлинение времени восстановления ЧСС почти в 4 раза при воздействии чужеродного для моллюска Cd приводит к снижению фильтрационной способности гемолимфы в полости сердечной сумки. Это, в свою очередь, нарушает физиологические механизмы экскреции. Неспецифическое связывание Cd обнаружено в базофильных клетках пищеварительной железы и в нефроцитах почки (Masson, Sinkiss, 1983). Для Cu, необходимого для процессов жизнедеятельности гидробионтов, время восстановления ЧСС увеличилось только 1,7 раза (Камардин и др., 2011). По-видимому, в этом случае фильтрация и экскреция страдает в меньшей степени. Кадмий, в процессе биохимической детоксикации переводятся из токсической, растворенной в гемолимфе ионной формы в менее биологически активную, связанную с металлотионеинами (Rainbow, 2002). При этом наблюдавшееся постепенное возвращение времени восстановления ЧСС к исходному уровню можно объяснить увеличением низкомолекулярных тионеиноподобных белков, связывающих растворимый пул кадмия и снижающих концентрацию его активной формы. В наших экспериментах только к 7 дню отмывки постепенно нормализовалась ЧСС, что совпадало, вероятно, с уменьшением концентрация Cd^{2+} в гемолимфе.

Результаты исследований указывают на то, что при воздействии на гидробионтов ТМ следует учитывать возможную роль некоторых ТМ в естественных физиологических и биохимических реакциях, а при проведении экологического мониторинга качества среды обитания гидробионтов обращать внимание на различную природу ТМ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 10-05-00875-а

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камардин Н.Н., Корниенко Е.Л., Удалова Г.П., Холодкевич С.В. Влияние ионов тяжёлых металлов на кардиорегуляторные рефлексы у моллюсков //Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Материалы III Междунар. конф. Петрозаводск. 2010. С. 71- 73
2. Камардин Н.Н., Кузнецова Т.В., Холодкевич С.В., Любимцев В.А., Иванов Ф.В., Корниенко Е.Л. Биоиндикация загрязнения поверхностных вод Белого моря тяжёлыми металлами на основе биомаркеров кардиоактивности брюхоногих моллюсков //Экологическая безопасность. 2009. №1-2 (21-22). С.61-64.
3. Камардин Н.Н., Любимцев В.А., Корниенко Е.Л., Удалова Г.П. Эффект воздействия тяжёлых металлов на защитные рефлексы у моллюсков (сравнительно-физиологический аспект) //Антропогенные влияния на водные организмы и экосистемы Материалы IV Всерос. конф. по

- водной экотоксикологии, посвящ. памяти Б.А.Флёрова. Борок. 2011. часть 1. С. 121- 126
4. Холодkevич 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 //Журн. эвол. биохим. и физиол. 2009. Т.45. № 4. С.432-434.
 5. Bryan G. W. Pollution due to heavy metals and its compounds //Marine Ecology. 1984. V.5. P. 1289-1431.
 6. 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. 99-116.
 7. Kiss T., Osipenko O.N. Toxic effects of heavy metals on ionic channels // Pharmacological Reviews. 1994. Vol. 46. № 3. P.245-267.
 8. Masson A.Z., Simkiss K. Interactions between metals and their distribution in tissues of *Littorina littorea* (L.) collected from clean and polluted sites. //J. Mar. Biol. Ass. UK., 1983. V. 63. P. 661-672.
 9. Rainbow P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? //Environ. Pollut., 2002; V.120 . P. 497-507.
 10. Styrihave 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.
 11. Szucs A., Salanki J., S-Rozsa K. Effects of chronic exposure to cadmium – or lead-enriched environments on ionic currents of identified in *Lymnaea stagnalis* L.//Cellular and Molecular Neurobiology. 1994. Vol.14. № 6. P. 769-780.
 12. Wihte K.N., Rainbow P.S. On the metabolic requirements for copper and zinc in mollusks and crustaceans // Mar. Environ. Res., 1985. V.16. P. 215-229.

THE CARDIAC ACTIVITY OF LITTORINA LITTOREA AS POSSIBLE BIOMARKER FOR ECOMONITORING THE SEA LITTORAL.

N. N. Kamardin, V. A. Lubimtsev, S. V. Kholodkevich, G.P. Udalova.
Saint- Petersburg Scientific Research Center for Ecological Safety, RAS

It is known of the hydrobiontes capacity to the bioaccumulation of heavy metals (HM). Kinetics and degree of expressed of this processes depend on that, whether HM is participant in biochemical and physiological reactions of the organism (essential HM) or it have no know biological function. Cardiac activity at sea literal mollusks (*Littorina littorea*. L.) was non-invasively registered in normal conditions and during CdCl₂. (non-essential HM) influence. Using the method of active testing (the standard hypoosmotic test – diluting of sea water for 50 %), a functional state of mollusk cardiosystem was investigated. The cardioactivity biomarker - time of HR recovery to initial level is considered as the indicator of mollusks adaptive possibilities. Chronic (11 days) CdCl₂ influence monotonously increased time of HR recovery almost in 4 times in comparison with testing of mollusks in normal sea water. It is supposed that cadmium infringes filtration and excretion processes and more considerable, than Cu influence – the metal take part in different biochemical and physiological processes at hydrobionts.

ОСОБЕННОСТИ БЕСПОЛОГО РАЗМНОЖЕНИЯ У ГОЛОТУРИИ *CLADOLABES SCHMELTZII*

Я.О. Каменев, И.Ю. Долматов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
e-mail: jarolkam@mail.ru

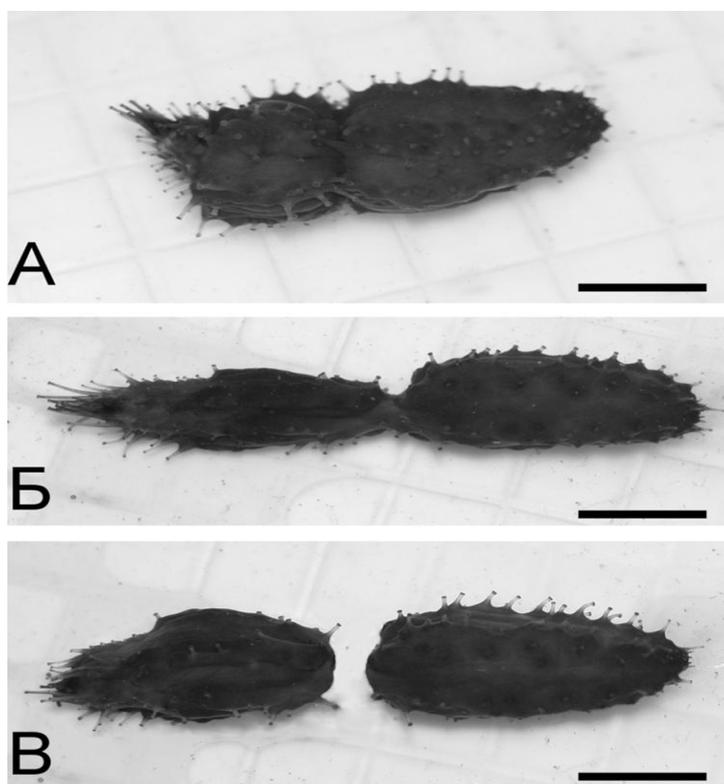
Бесполое размножение является наиболее древним способом размножения организмов. У современных животных оно служит дополнением к половому размножению, помогая увеличивать численность вида, а также способом переживания неблагоприятных условий. У иглокожих такой способ репродукции встречается достаточно редко. Он отмечается на личиночной стадии у представителей всех классов Echinodermata, за исключением морских лилий (Balser, 2004). Во взрослом состоянии бесполое размножение отмечено для некоторых видов морских звезд, офиур и голотурий (Emson, Wilkie, 1980). Способность голотурий к бесполому размножению путем поперечного деления известна с конца 19 века (Monticelli, 1896). В последнем обзоре, вышедшем в 1980 году (Emson, Wilkie, 1980), указывалось только 4

вида таких голотурий. В дальнейшем было описано еще 9 видов, у которых встречается бесполое размножение (O'Loughlin, O'Hara, 1992; Conand et al., 1997; Kohtsuka et al., 2005; Lee et al., 2006; O'Loughlin et al., 2009). Таким образом, открытие в последние годы новых видов голотурий, способных к поперечному делению, указывает на то, что распространение этого типа размножения в классе Holothuroidea, вероятно, гораздо шире, чем считалось ранее.

Голотурия *Cladolabes schmeltzii* широко распространена в западной Индо-Пацифике, от Австралии до южного побережья КНР (Massin, 1999). В ходе исследования морфогенетических потенций иглокожих, обитающих в заливе Нячанг Южно-Китайского моря, нами было установлено, что этот вид способен к бесполому размножению путем поперечного деления.

Место деления располагалось примерно в средней части тела, немного ближе к переднему концу. Деление начинается с формирования узкой перетяжки стенки тела. Затем, в течение нескольких часов, перетяжка становится более глубокой и широкой (рис А). В процессе деления задняя часть голотурии прикрепляется с помощью амбулакральных ножек к субстрату и остается неподвижной, в то время как передняя часть пытается ползти вперед. Это приводит к истончению и удлинению места деления (рис Б). Затем передний фрагмент перестает двигаться, и обе части животного сокращаются и сближаются. Голотурия остается неподвижной в течение 30–40 мин, после чего передняя ее часть снова начинает ползти вперед. После нескольких таких фаз растяжения и сокращения тело голотурии разделяется на две половинки (рис В). Весь процесс деления при искусственных условиях содержания занимает около 24 ч.

Было проанализировано 154 особи *C. schmeltzii* на наличие у них признаков бесполого размножения. Оказалось, что среди них около 21,7% животных находятся на разных стадиях роста после поперечного деления. У них отсутствовала либо передняя, либо задняя часть тела. При вскрытии оказалось, что голотурии с отсутствующим или растущим передним концом содержали клоаку, большую часть кишки нормального строения и оба водных легких. У животных, у которых отсутствовала или отрастала задняя часть, имелся хорошо развитый аквафарингеальный комплекс (АК), от которого отходил остаток кишки. Последний у разных особей имел разную длину, что, вероятно, зависело от стадии развития после деления. Кроме того, в переднем фрагменте сохранялись мускулы-ретракторы АК и гонада.



Последовательные стадии деления голотурии *Cladolabes schmeltzii*

Развитие внутренних органов после поперечного деления у *C. schmeltzii* можно представить следующим образом. В передних фрагментах в течение какого-то времени происходит атрофия оставшейся части кишки. В результате она редуцируется вплоть до уровня пищевода. Затем от остатка пищевода по кишечному мезентерию начинает отрастать зачаток. Последний постепенно удлиняется и растет назад. Одновременно с этим процессом на заднем конце переднего фрагмента формируется клоака. Зачаток кишки врастает в него, в результате чего целостность пищеварительной системы восстанавливается. На клоаке по бокам возникают выросты – зачатки водных легких. Последние постепенно растут вперед. В задних фрагментах основным процессом является развитие АК. Он формируется в виде утолщения в точке схождения амбулакров. Передняя часть кишки утончается и растет вперед по мезентерию. Образующийся таким образом зачаток врастает в АК.

Наше исследование дает основание предполагать, что основные этапы формирования внутренних органов у *C. schmeltzii* сходны с таковыми у других видов голотурий (Emson, Mladenov, 1987; Conand et al., 1997). Среди видов, способных к бесполому размножению, большинство (9 видов) принадлежит отряду Aspidochirotida (Emson, Wilkie, 1980; Harriott, 1980; Conand et al., 1997; Uthicke, 1997; Kohtsuka et al., 2005; Lee et al., 2006). Остальные 5, включая *C. schmeltzii*, относятся к отряду Dendrochirotida. Первые два вида дендрохиротид были обнаружены более 100 лет назад. Это *Ocnus (Cucumaria) planci* и *O. (C.) lactea* (Emson, Wilkie, 1980). *O. planci* обитает в Атлантическом океане, а *O. lactea* – в Атлантическом океане и Средиземном море (Emson, Wilkie, 1980). Позднее были опубликованы данные о дендрохиротидах, способных к поперечному делению, которые обитают у берегов Австралии: *Squatocnus aureoruber* (O'Loughlin, O'Hara, 1992) и *Cucuvitrum rowei* (O'Loughlin et al., 2009). Все вышеперечисленные виды относятся к семейству Cucumariidae. Голотурия *C. schmeltzii* относится к семейству Sclerodactilidae. Таким образом, *C. schmeltzii* является первым для северной части Индо-Пацифики видом дендрохиротид, для которого установлено наличие бесполого размножения. Кроме того, это пока единственный вид из семейства Sclerodactilidae, способный к поперечному делению.

Авторы выражают благодарность директору Института океанографии ВАНТ Буи Хон Лонгу и сотрудникам Департамента живых биоресурсов за возможность работать в ИО ВАНТ, а также Т.Н. Даутовой и С.Ш. Даутову за помощь в работе. Работа выполнена при поддержке грантов Правительства России (№ 11.G34.31.0010) и Российского фонда фундаментальных исследований (№11-04-00408).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Balser E. J. Cloning by larvae of echinoderms // Echinoderms: München / Heinzeller T., Nebelsick J. H. (eds). London: Taylor & Francis Inc, 2004. P. 3-9.
2. Conand C., Morel C., Mussard R. A new study of asexual reproduction in holothurian: Fission in *Holothuria leucospilota* populations on Reunion Island in Indian Ocean // SPC Beche-de-Mer Information Bulletin. 1997. Vol. 9. P. 5–11.
3. Emson R.H., Wilkie I.C. Fission and autotomy in echinoderms // Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 1980. Vol. 18. P. 155–250.
4. Kohtsuka H., Arai S., Ushimura M. Observation of asexual reproduction by natural fission of *Stichopus horrens* Selenka in Okinawa Island, Japan // SPC Beche-de-Mer Information Bulletin. 2005. Vol. 22. P. 23.
5. Lee J., Byrne M., Uthicke S. To split or not to split? A study of fission in tropical holothuroids and the carrying capacity of the environment // SPC Beche-de-Mer Information Bulletin. 2006. Vol. 23. P. 41.
6. Massin C. Reef dwelling holothurians (Echinodermata) of the Spermonde Archipelago (South-West Sulawesi, Indonesia) // Zoologische Verhand. 1999. Vol. 329. P. 1–144.
7. Monticelli F.S. Sull' autotomia delle *Cucumaria planci* (Br) // Atti Accad. Naz. Lincei Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Rend. Ser.5. 1896. Vol. 5. P. 231–239.
8. O'Loughlin P.M., Eichler J., Altoff L., Falconer A., Mackenzie M., Whitfield E., Rowley C. Observations of reproductive strategies for some dendrochirotid holothuroids (Echinodermata: Holothuroidea: Dendrochirotida) // Memoirs of Museum Victoria. 2009. Vol. 66. P. 215–220.
9. O'Loughlin P.M., O'Hara T.D. New cucumariid holothurians (Echinodermata) from southern Australia, including two brooding and one fissiparous species // Memoirs of Museum Victoria. 1992. Vol. 53. P. 227–266.

PECULIARITIES OF ASEXUAL REPRODUCTION OF THE HOLOTHURIAN *CLADOLABES SCHMELTZII*

Ya.O. Kamenev, I.Yu. Dolmatov

We found the holothurian *Cladolabes schmeltzii* from Nha Trang Bay (South China Sea) is capable to asexual reproduction by fission. The site of fission is situated at about the middle of the body, so two nearly equal halves are formed as a result of the fission. The fission started from formation of a narrow constriction of the body wall. During several hours, the constriction became deeper and broader. In the process of fission, the posterior part of the holothurian attached to the substrate by its ambulacral feet and remained motionless, while the anterior part tried to crawl forward, this caused thinning and stretching of the constriction. Then, the anterior fragment ceased to move, and both parts of the animal were constricted and approached each other. The animal remained motionless for 30-40 min, and then the anterior part resumed crawling forwards. Several phases of such constrictions and stretchings resulted in dividing the holothurian's body into two halves. Under laboratory conditions, the process of fission took about 24 hours. Thus, *C. schmeltzii* is the first dendrochirotid species of the North Indo-Pacific capable to fission. Besides, it remains so far a single species of the family Sclerodactilidae with recorded asexual reproduction.

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ РЫБ В СУБЛЕТАЛЬНО ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ.

Д.С. Капшай, В.К. Голованов

ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, п. Борок,
Ярославской обл., Россия, kapsh@ibiw.yaroslavl.ru

Изменение климата в последние десятилетия приводит к существенным модификациям в рыбном населении пресноводных экосистем. Наблюдаются сравнительное увеличение и качественная трансформация видового разнообразия, появление в водоемах чужеродных видов, проникновение видов-вселенцев в северные части ареала распространения, исчезновение холодолюбивых рыб-аборигенов. В районах «термального загрязнения» рек, озер и водохранилищ, а иногда и в естественных водоемах, нередко возникает ситуация (Голованов, 2001), при которой в летние месяцы температура воды превышает критический порог в 30°C (зона генотоксичных сублетальных воздействий на организм некоторых видов рыб). Одним из главных факторов внешней среды, которые определяют эти явления, является температура. Таким образом, изучение температурных границ жизнедеятельности как пресноводных, так и морских видов рыб в последнее время становится все более актуальным и своевременным.

Построение полигона термоустойчивости (внутри которого располагаются зоны оптимального питания, роста и воспроизводства) от нижних до верхних летальных температур производится на основе различных методов определения летальных температур рыб. Спектр методов – температурного скачка, критического термического максимума-минимума, хронического летального максимума-минимума и их варианты – необычайно широк и часто не позволяет делать однозначные выводы (Becker, Genoway, 1979; Beitinger et. al., 2000; Голованов, 2012). Существенно больше данных, характеризующих диапазон верхних летальных температур (ВЛТ) в сравнении с областью нижних летальных температур (НЛТ) рыб. В последние годы для изучения ВЛТ рыб чаще применяют методы критического термического максимума (КТМ) и хронического летального максимума (ХЛМ).

Зависимости ВЛТ от температуры акклимации, скорости нагрева, сезона года, времени суток, возраста рыб и ряда других факторов изучены более полно (Golovanov, 2012). В то же время молекулярно-генетические, биохимические, физиологические и эколого-поведенческие особенности термоустойчивости рыб и к высоким, и к низким температурам все еще остаются предметом дискуссии или обсуждения, нежели точного знания. Недостаток исследований по этому вопросу вызван и тем, что адаптации рыб в области верхних температурных границ жизнедеятельности – только одна форма из нескольких известных форм температурных адаптаций.

Сочетание и степень проявления разных форм температурных адаптаций определяет границы температур, в пределах которых организм способен проявлять биологическую активность. Все разнообразие адаптационных процессов осуществляется при помощи

генотипических (в реализации которых участвует естественный отбор) и фенотипических механизмов (связанных с физиологической и метаболической пластичностью организмов). Адаптационные механизмы к температуре среды формируются на разных уровнях: молекулярном, молекулярно-генетическом, метаболическом, клеточном, физиологическом, организменном, видовом, популяционном, биоценотическом.

Температурные адаптации на молекулярном уровне определяются термостабильностью белков и нуклеиновых кислот, постсинтетическими модификациями белков, физическим состоянием мембран и др. Термостабильность белков – один из важнейших механизмов температурной адаптации. Устойчивость белков к воздействию высоких температур формируется на разных уровнях их структуры и определяется свойствами как самого белка, так и его взаимодействием с различными эффекторами. Стабильность белков определяется в основном нековалентными внутримолекулярными связями (водородные, ионные, ван-дер-ваальсовы). Взаимосвязь между температурой обитания и функциональными и структурными свойствами ферментов, наряду с гомойотермными, показана и для многих пойкилотермных животных. В свою очередь, функциональная активность ферментов и других мембранных белков зависит от их липидного окружения. Агрегатное состояние липидов мембран играет существенную роль в приспособлении к разным температурным условиям. Изменение степени вязкости мембранных липидов под влиянием температуры, регулирующее многие важные функции мембран, вносит существенный вклад в приспособление организма к меняющимся условиям среды (Ночачка, Somero, 2002; Озернюк, 2000).

Температурные адаптации на уровне клеток и тканей определяются соответствующими биохимическими изменениями, а также регулирующим влиянием со стороны эндокринной и нервной систем. Особенность адаптаций к различным температурам среды на клеточном и тканевом уровнях зависит от продолжительности влияния температуры. Таким образом, в основе акклимации лежат процессы регулирования биосинтезов, на уровне транскрипции, т.е. процессы репрессии-дерепрессии клеточного генома. Исходя из этого, важен вопрос, какова природа сигнала, который должен прийти от наружных мембран клетки к ее ядру, сообщая об изменениях внешней среды. Можно говорить о трех формах внутриклеточных сигналов, тормозящих или возбуждающих генную активность: 1) изменение внутриклеточных концентраций неорганических ионов (к тому же это может использоваться для активации генома в случае соленостной и осмотической акклимации); 2) образование по сигналу с наружной поверхности клетки на ее внутренней поверхности внутриклеточных медиаторов; 3) продукты избирательного протеолиза – фрагменты белков, образующихся в клетке по сигналу извне под воздействием активированных протеолитических ферментов (Хлебович, 1981).

Механизмы температурной адаптации, затрагивающие метаболические процессы, прежде всего, направлены на реагирование ферментного аппарата клетки при изменении температуры среды. Возможны два способа компенсации температурного воздействия: 1) изменение активности ферментов и их каталитических свойств; 2) изменение концентрации ферментов. Показано, что такой кинетический параметр как константа Михаэлиса (K_m), отражающая эффективность функционирования фермента, в области оптимальных температур имеет минимальное значение и положение минимума этой константы соответствует температуре обитания или оптимальным температурным условиям. Таким образом, динамика перестройки функциональных свойств фермента в ходе температурной акклимации в течение 2-3 недель позволяет сделать вывод о «подстраивании» кинетических характеристик ферментов под новую температуру среды (Озернюк, 2000; Ночачка, Somero, 2002).

Верхний предел активной жизни рыб близок к 52°C, многие рыбы погибают при воздействии существенно более низких температур. Несмотря на большое количество выполненных исследований, эколого-физиологические и биохимические причины и механизмы гибели рыб в зоне аномально высоких и, особенно, низких температур остаются не столько выясненными, сколько предположительными. К их числу относят гибель животных от изменения структуры мембран, денатурации белков и их коагуляции в результате нагрева, термической инактивации ферментов (со скоростью, превышающей скорость их синтеза), недостатка кислорода, различия в температурном коэффициенте (Q_{10}) для взаимосвязанных метаболических реакций, нарушения водно-солевого баланса рыб (Шмидт-Ниельсен, 1982 и др.). Стоит отметить имеющиеся противоречия данным причинам: так летальная температура

для рыб рода *Trematomus* – 6°C. Затруднительно предполагать, что при этой температуре происходит денатурация белков и инактивация ферментов, а устранение дефицита кислорода не приводит к повышению уровня летальных температур.

Определяющую роль в температурных адаптациях на границах температурного диапазона жизнедеятельности играют белки теплового шока, активируемые соответствующими генами при резком увеличении температуры среды (Озернюк, 2000). Предположительно, синтез белков теплового шока может быть связан с энергетическим метаболизмом клетки. В последнее время появились сведения и о существовании белков холодового шока. Особенно важны новые данные о том, что в диапазоне температур от 34 до 38°C тепловой шок является для рыб генотоксичным, поскольку вызывает увеличение частоты аббераций хромосом в метафазе, а также приводит к одноцепочечным повреждениям ДНК (Anitha et. al., 2000).

Выявление эколого-биохимических основ адаптации водных животных к высоким и низким температурам зависит от того, насколько детально будут обобщены зависимости летальных температур от факторов среды и биологического статуса рыб. Температуры акклимации животных, время суток, сезон года, фотопериод, эндокринная деятельность, особенности обмена веществ, возраст рыб, их пол и стадия зрелости, эколого-биохимический и иммунологический статус, голодание, инфекции, содержание токсикантов и тяжелых металлов, а также уровень тепловых нагрузок – далеко не полный перечень факторов, оказывающих влияние на термоустойчивость рыб.

Важный момент изучения ВЛТ – учет некоторых особенностей их определения. В-первых, исследование ВЛТ у рыб в максимально возможном широком диапазоне температур. В-вторых, использование широкого спектра скоростей нагрева (или охлаждения) подопытных особей. В-третьих, оценка ВЛТ во все 4 сезона года, особенно в экстремальный зимний и продуктивный летний. В-четвертых, анализ ВЛТ у рыб самых разных возрастов в различные периоды онтогенеза, от эмбрионального до периода половозрелого организма. В-пятых, использование «принципа» разного физиологического состояния, нормы и патологии. И, наконец, в-шестых, подбор модельных видов, например, тепло- и холодолюбивых, видов с разным типом питания и отличающихся по экологии. Все это существенно прояснит эколого-физиологические и биохимические механизмы устойчивости и гибели рыб в высоких и низких температурах.

Унификация методов определения термоустойчивости, выявление механизмов гибели рыб, классификация и выяснение роли факторов, определяющих термоустойчивость – важные элементы полносистемного изучения температурных адаптаций рыб.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Голованов В.К., Смирнов А.К., Болдаков А.М. Воздействие термального загрязнения водохранилищ Верхней Волги на рыбное население: современное состояние и перспективы // Актуальные проблемы рационального использования биологических ресурсов водохранилищ. Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский Дом печати», 2005. С. 59–81.
2. Голованов В.К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Москва: ИПЭЭ РАН, 2012. 47 с.
3. Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: Изд-во Московского ун-та, 2000. 205 с.
4. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 1981. 136 с.
5. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. Т. I. М.: Мир, 1982. 416 с.
6. Anitha B., Chandra N., Gopinath P.M., Durairaj G. Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*) // Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 2000. V. 469. № 1. P. 1–8.
7. Becker C.D., Genoway R.G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. V. 4. № 3. P. 245–256.
8. Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. V. 58. № 3. P. 237–275.
9. Golovanov V.K. Influence of various factors on upper lethal temperature (review) // Inland Water Biology. 2012. V. 5. № 1. P. 105–112.

10. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution // Oxford-New York: Oxford University Press, 2002. 466 p.

ECOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MECHANISMS FOR ADAPTATIONS OF FISHES IN SUBLETHAL HIGH TEMPERATURES.

D.S. Kapshay, V.K. Golovanov.

The reasons both mechanisms of fishes tolerance and death in a zone of high and low temperatures are briefly analysed. The ecological, physiological and biochemical mechanisms of tolerance to high temperatures of environment are considered as a component of adaptation of fishes to high temperatures. At the same time adaptation of fishes in a sublethal and lethal temperatures zone is submitted as one of the forms of temperature adaptations. The examples of experimental data on upper lethal temperatures at freshwater fishes in conditions of different rates of heating, distinct acclimation temperatures, in various seasons and at fishes of different age are given.

УСТОЙЧИВОСТЬ И ПЛАСТИЧНОСТЬ ВКУСОВОЙ РЕЦЕПЦИИ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

А.О. Касумян

Биологический факультет Московского государственного университета им.

М.В.Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: alex_kasumyan@mail.ru

Вкусовая рецепция играет определяющую роль в регуляции пищевого поведения животных и обеспечивает избирательное потребление адекватных кормовых объектов. У рыб вкусосная система достигает высокого уровня структурного и функционального развития. В отличие от других позвоночных животных, у рыб вкусосные рецепторы находятся не только в ротовой полости, но у многих видов располагаются на внешней поверхности тела, начиная от приротовой зоны и заканчивая хвостовым стеблем и плавниками. Общее число вкусосных почек у рыб достигает 1 млн. шт., а их плотность на единицу поверхности – до нескольких сотен на 1 мм², что может быть многократно выше, чем у других животных (Finger et al., 1991). Вкусосная чувствительность у рыб по электрофизиологическим данным составляет 10⁻⁸-10⁻¹¹ М, а действующими стимулами для вкусосной системы являются различные химические вещества (аминокислоты, карбоксильные кислоты, амины, нуклеотиды, нуклеозиды, сахара, соли и многие другие) и их сложно компонентные композиции (экстракты пищевых организмов, смеси химических соединений) (Rolen, Caprio, 2008).

Исследования вкусосных предпочтений рыб, выполненные в последние годы, позволили выяснить многие базовые вопросы вкусосной рецепции рыб. С помощью разработанных поведенческих тестов установлено, что химические вещества одного класса могут обладать разными вкусосными свойствами для рыб одного вида. Некоторые из веществ придают искусственным пищевым объектам высокую вкусосную привлекательность для рыб (вкусосные стимуляторы), другие обладают негативными свойствами (детерренты) или не вызывают значимых изменений в потреблении (индифферентные вкусосные вещества). Вкусосные спектры характеризуются высокой видовой специфичностью: одни и те же вещества для разных видов рыб, часто близкородственных или сходных по образу жизни и питанию, могут иметь несовпадающие или противоположные вкусосные свойства (Kasumyan, Døving, 2003). В то же время, внутривидовые отличия вкусосных спектров отсутствуют и вкусосные предпочтения, проявляемые индивидуумами из разных популяций, в том числе географически изолированных и удаленных друг от друга, или особями, относящимися к разным морфобиологическим формам, значимо не отличаются (Касумян, Сидоров, 2005; Касумян, Михайлова, 2007).

Вывод о видовом своеобразии и других особенностях вкусосных предпочтений не может быть в полной мере обоснованным без данных, свидетельствующих об устойчивости вкусосных спектров, их состава и относительной эффективности входящих в них стимулов, к влиянию различного рода факторов биотической и абиотической природы, состояния рыб и т.п. Нами было выяснено, что вкусосные предпочтения стабильны во времени, они близки у особей,

имеющих одинаковое происхождение, но относящихся к разным поколениям. Интервал не только в несколько месяцев, но и в несколько лет, за которые у короткоцикловых рыб, таких как девятииглые колюшки *Gasterosteus aculeatus*, сменяется несколько поколений, не приводит к каким-либо значимым сдвигам во вкусовых предпочтениях (Фокина, Касумян, 2003).

Известно, что поведение и большинство физиологических процессов у рыб зависят от внешних факторов, таких как температура и соленость воды, от состояния рыб, определяемого режимом питания, зрелостью гонад, миграционным состоянием и др. Насколько устойчивы вкусовые предпочтения рыб к действию внешних абиотических факторов и к изменению физиологического статуса организма? Ответ на этот вопрос важен для понимания того, насколько значимыми для выбора рыбами пищевых объектов могут быть изменения различных внешних условий, так часто происходящие в природных водоемах. Решение этого блока задач было начато с оценки влияния на вкусовые ответы рыб уровня пищевой мотивации - фактора, наиболее тесно связанного с питанием и пищевым поведением животных. Оказалось, чувство голода серьезно модифицирует пищевые спектры у рыб и сокращает в них количество детеррентных стимулов. Наиболее сильные и быстрые сдвиги наблюдаются в течение первых 24 ч голодания, наступившего после длительного кормления рыб в режиме *ad libitum*. Вызванная голоданием потеря многими веществами отталкивающих (детеррентных) вкусовых свойств, переход этих веществ в группу индифферентных стимулов и одновременно с этим сохранение привлекательными веществами своих исходных вкусовых свойств – все это может рассматриваться в качестве основных механизмов, обеспечивающих использование в пищу голодающими рыбами новых объектов, ранее потреблявшихся лишь эпизодически или полностью ими избегавшихся (Касумян, Сидоров, 2010). Эти изменения объясняют наблюдающуюся при недостаточном питании меньшую требовательность рыб к пище и потребление ими более доступного, но менее привлекательного корма.

Не менее важен вопрос о зависимости вкусовых предпочтений рыб от другого трофического фактора – индивидуального пищевого опыта особи, т.е. от потребляемого (привычно) типа корма. Эта задача была решена на примере белого амура *Ctenopharyngodon idella*, для молоди которого животная и растительная пища является адекватной. Такая особенность биологии белого амура была решающей при выборе объекта. Схема эксперимента заключалась в длительном (6 месяцев) выращивании двух групп молоди белого амура, полученной от одной пары производителей, на разных кормах – на животной пище (зоопланктон и затем мотыль) или растительной (листья салата *Lactuca sativa* и ряска *Lemna minor*). Выполненное исследование обнаружило почти полное совпадение вкусовых предпочтений особей двух сравниваемых групп ($R_s = 0.74$; $p < 0.001$). Эти результаты позволили прийти к очень важному заключению о слабом влиянии индивидуального пищевого опыта рыб на вкусовые предпочтения и о строгой генетической детерминированности вкусовых спектров.

Не происходит каких-либо существенных изменений вкусовых предпочтений у рыб при резких сдвигах солености воды. Трехиглые колюшки *Gasterosteus aculeatus* – эвригалинные рыбы, легко выдерживающие быстрые и резкие перепады солености, и в пресной воде, и в морской воде сохраняют неизменным отношение к вкусу многих использованных для тестирования веществ, в том числе к хлористому натрию, несмотря на то, что фоновое присутствие этой соли в воде отличалось почти на 4 порядка (Михайлова, Касумян, 2010). Изменение температуры воды – другого важнейшего для рыб абиотического фактора, может изменять вкусовые спектры, однако в целом, эти изменения нельзя признать драматичными (Касумян и др., 1993).

Гораздо более серьезные нарушения в функционировании вкусовой системы возникают при появлении в воде загрязняющих веществ, таких как тяжелые металлы. Соли ртути, меди, цинка, свинца, кадмия в сублетальных концентрациях вызывают практически мгновенный выход вкусовых рецепторов из строя и в результате рыбы полностью теряют способность оценивать вкусовые свойства корма. Интересно, что пищевая мотивация у рыб сохраняется неизменной, но потребление пищи резко снижается и уже не зависит от присутствия в нем детеррентных или привлекательных вкусовых веществ. Глубина наблюдаемого эффекта определяется концентрацией загрязняющих веществ и продолжительностью воздействия (экспозицией). После

острого, однократного токсического воздействия, способность рыб распознавать и адекватно реагировать на вкусовые агенты восстанавливается спустя несколько дней.

Питание рыб в естественных условиях неизбежно сопровождается восприятием и оценкой жертв с помощью многих сенсорных систем одновременно, в том числе обонятельными и вкусовыми рецепторами. Опыты, проведенные нами на карпе *Cyprinus carpio* и треске *Gadus morhua*, в какой-то мере имитировали питание рыб в условиях полимодального восприятия пищи: рыбам предъявляли искусственные гранулы разного вкусового качества на фоне пищевого запаха и при его отсутствии (в чистой воде). Как и ожидалось, в присутствии запаха пищевая активность рыб усиливалась, они чаще схватывали все гранулы, однако относительное потребление разных типов гранул сохранилось на прежнем уровне. Увеличение частоты повторных тестирований происходило при предъявлении рыбам гранул с непривлекательным вкусом, что, является, по-видимому, результирующей столкновения информации, заключённой в двух противоположных по знаку и разных по модальности пищевых химических сигналах – обонятельном и вкусовом. Обонятельная стимуляция, вызываемая запахом знакомого и привлекательного корма, не соответствует индифферентному или малопривлекательному вкусу схваченного объекта, а вызванное запахом пищевое возбуждение вынуждает рыб к отказу от потребления такого объекта и к поиску нового, в большей мере подходящего по вкусовым свойствам (Касумян и др., 2009). Эти результаты показывают, что для интенсификации питания схваченные рыбами пищевые объекты должны обладать определенными вкусовыми качествами, соответствующими потребностям конкретного вида-консумента. Только в этом случае сложная, многозвенная цепь пищевого поведения завершится потреблением корма, а не прервётся раньше, на одном из промежуточных этапов. Несмотря на то, что интенсивность пищедобывательного поведения у рыб, попадающих в зону пищевого запахового поля, повышается и ими схватывается большее число потенциальных объектов питания, произойдёт рост реального потребления только тех из них, которые характеризуются достаточно высокой вкусовой привлекательностью. Отвергание рыбами объектов, не удовлетворяющих таким требованиям, из-за возникающего противоречия между информацией, получаемой по двум разным хемосенсорным каналам, резко возрастет.

Поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект 10-04-00349), Федеральным агентством по науке и инновациям (Госконтракты №14.740.11.0165, №16.740.11.0174) и Программой “Ведущие научные школы” (проект НШ-719.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Касумян А.О., Марусов Е.А., Сидоров С.С. Влияние запахового фона на вкусовые предпочтения и вкусовое поведение карпа *Cyprinus carpio* и трески *Gadus morhua* // Вопр. ихтиологии. 2009. Т.49. №4. С.528–540.
2. Касумян А.О., Михайлова Е.С. Сравнение вкусовой рецепции и поведения двух форм трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*: *trachurus* и *leirus* // ДАН. 2007. Т.413. № 5. С.711–713.
3. Касумян А.О., Сидоров С.С. Вкусовые предпочтения кумжи *Salmo trutta* трех географически изолированных популяций // Вопр. ихтиологии. 2005. Т.45. № 1. С.117–130.
4. Касумян А.О., Сидоров С.С. Влияние голодания на вкусовые предпочтения и поведение тестирования пищевых объектов у карпа *Cyprinus carpio* // Вопр. ихтиологии. 2010. Т. 0. № 3. С.388–399.
5. Касумян А.О., Сидоров С.С., Пашенко Н.И. Влияние температуры воды на вкусовую чувствительность молоди севрюги *Acipenser stellatus* к свободным аминокислотам // ДАН. 1993. Т.331. № 2. С.248–250.
6. Михайлова Е.С., Касумян А.О. Вкусовые предпочтения и пищевое поведение трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* в морской и пресной воде // Вопр. ихтиологии. 2010. Т.50. № 6. С.828–840.
7. Фокина Е.С., Касумян А.О. Сравнение вкусовых предпочтений у разных поколений популяции девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* (*Gasterosteiformes*) // ДАН. 2003. Т.389. № 4. С.570–573.
8. Finger T.E., Drake S.K., Kotrschal K., Womble M., Dockstader K.C. Postlarval growth of the peripheral gustatory system in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* // J. Comp. Neurology. 1991. V.314. P.55-66.
9. Kasumyan A. Døving K.B. Taste preferences in fish // Fish and Fisheries. 2003. V.4. №4. P.289–347.

10. Rolen S.H., Caprio J. 2008. Bile salts are effective taste stimuli in channel catfish // J. Exp. Biol. 2008. V.211. P.2786-2791.

STEADINESS AND PLASTICITY OF FISH TASTE RECEPTION TO A VARIOUS FACTORS

A.O. Kasumyan

Steadiness and plasticity of taste perception in fish were studied. Taste preferences are strongly similar in conspecifics from geographically isolated populations or belonged to different morpho-biological forms. Taste preferences are stable and invariable in conspecifics of different generations. Taste preferences in fish show low plasticity (in relation to the diet), appear to be highly determined genetically. Water salinity and water temperature do not shifts strongly the palatability of artificial pellets with different taste substances but fish feeding motivation and contamination of water by pollutants such as heavy metals may shift fish taste preferences more dramatically.

РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОНТНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ ОЗ. ЧАНЫ

Е.Н. Кашинская¹, Е.В. Суханова², М.М. Соловьев¹, Г.И. Извекова³

¹Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, Россия

²Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

³Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

E-mail: Elena.kashinskaya@inbox.ru

Водная среда обитания представляет собой открытую систему, в которой гидробионты постоянно взаимодействуют с микроорганизмами, присутствующими в толще воды и в донных отложениях (Mondal, 2010). Эти микроорганизмы участвуют в формировании микрофлоры кожных покровов, жабр и пищеварительного тракта гидробионтов, в том числе и рыб (Austin, 2002). Изучение кишечной микрофлоры рыб представляет огромный интерес, поскольку она играет важную роль в обеспечении защитных функций организма и питания рыб. Показано, что симбионтные бактерии препятствует колонизации кишечника патогенными микроорганизмами. Кишечная микрофлора может предоставлять организму-хозяину необходимые питательные вещества, такие как аминокислоты, глюкозу, жирные кислоты, минеральные вещества и витамины. Показан также вклад ферментов микрофлоры в переваривании компонентов пищи рыб (белков, жиров и углеводов) (Извекова, 2005).

Пищеварительный тракт рыб населяют различные микроорганизмы, поступающие из воды и пищи (Austin, 2002). Кишечная микрофлора рыб представлена аэробными, факультативно и облигатно анаэробными бактериями. В пищеварительном тракте рыб различают временно присутствующую аллохтонную микрофлору, поступающую с водой и пищей, и автохтонную микрофлору, постоянно населяющую его слизистую поверхность (Ringo et al. 2006).

Видовой состав кишечной микрофлоры зависит от абиотических и биотических факторов среды (сезона года, солености, температуры, возраста, типа питания рыбы и др). Известно, что тип питания обуславливает определенный состав кишечной микрофлоры у хищных и мирных рыб (Шивокене, 1989).

Видовой состав кишечной микрофлоры рыб традиционно изучается методами культивирования. Данный подход имеет существенное ограничение, поскольку не все группы бактерий можно культивировать (Spangaard et al., 2000).

В настоящее время для изучения видового разнообразия микрофлоры в пищеварительном тракте рыб перспективным является использование методов молекулярно-генетического анализа. Данные методы основаны на амплификации фрагмента гена 16S рРНК бактерий и позволяют точнее охарактеризовать разнообразие микрофлоры кишечника исследуемых видов рыб.

Цель исследования – определить разнообразие симбионтной микрофлоры пищеварительного тракта некоторых хищных и мирных рыб оз. Чаны методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Место и объекты исследования. Сбор материала проводили на территории речной системы бассейна озера Чаны – нижнее течение р.Каргат, в июне-августе 2011 года. Озеро Чаны – самое крупное бессточное озеро Западно-сибирской низменности и территории Новосибирской области (Пульсирующее озеро Чаны, 1982). В работе использованы сеголетки (0+) 6 видов рыб, из них: серебряный карась *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) (4 особи), плотва сибирская *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) (5 особей), елец сибирский *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1874) (6 особей), обыкновенный судак *Stizostedion lucioperca* (Linnaeus, 1758) (3 особи), окунь речной *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758) (3 особи) и обыкновенная щука *Esox lucius* (Linnaeus, 1758) (1 особь).

Отбор проб и выделение ДНК. Рыб отлавливали мальковым бреднем (размер ячеи 6 мм). Затем в течение одного часа живых рыб доставляли в лабораторию, где проводили их вскрытие. У рыб также измерялась длина тела и масса.

Кожные покровы рыбы освобождали от слизи, дезинфицировали спиртом, и с помощью стерильных инструментов разрезали брюшную полость и извлекали желудочно-кишечный тракт. Желудок, кишечник, содержимое анализировались отдельно друг от друга. Выделение ДНК проводили с использованием коммерческих наборов на сорбентах – ДНК-сорб В, ДНК-сорб С, Рибо-сорб (МФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) согласно протоколу.

Аmplификация фрагмента гена 16S рРНК бактерий. В состав реакционной смеси (объем 25 мкл) для проведения полимеразной цепной реакции входили следующие компоненты: 1х ПЦР буфер (из 10х ПЦР буфера), 2,5 мМ MgCl₂, смесь 1 мМ dNTP, 10 пмоль каждого праймера, Taq-полимераза 1 единица активности.

Для амплификации использовали следующие пары праймеров: 500L-1350R (Eubacteria); 109L-958R (Euryarchaeota); 333L-958R (Euryarchaeota); 27F-B-K1R (Firmicutes); 338F-B-K1R (Firmicutes); LGC353F-1542R (Firmicutes); 27F-685R (a-Proteobacteria); 35F-685R (Alphaproteobacteria); 35F-1542R (Betaproteobacteria); 352L-920R (Planctomycetes); 540L-1542R (Chlamydiae/Verrucomicrobia); 106L-500R (Cyanobacteria); 106L-785R (Cyanobacteria); 359L-682R (b-Proteobacteria) (Белькова Н., 2008).

Режим для амплификации на групп-специфичных праймерах был следующим: предварительная денатурация матрицы (ДНК) 94⁰С – 3 мин (1 цикл); денатурация матрицы 94⁰С – 45 сек, отжиг праймеров 58⁰С – 45 сек, элонгация 72⁰С – 1 мин (35 циклов); постэлонгация 72⁰С – 3 мин (1 цикл). Использовали амплификатор «БИС» М-111-05 (термоциклер).

Продукты амплификации детектировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1хТАЕ с добавлением этидиума бромида. Ампликоны визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансэлюминаторе (ЕСХ-26.МХ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При идентификации филума Eubacteria в кишечнике и химусе как для хищных, так и для мирных рыб детектируется бактериальная ДНК (рис.1). Длина бактериального ампликона составляла 850 п.н. Обнаружение неспецифической полосы, размером 1100 п.н. указывает на присутствие ДНК не бактериального происхождения (возможно ДНК рыб). Наличие неспецифических полос в результате амплификации тотальной ДНК объясняется трудностью разделения бактериальной ДНК и ДНК других организмов.

Разнообразие микрофлоры химуса мирных и хищных рыб. Использование бактериальных групп-специфичных праймеров для идентификации представителей филума Euryarchaeota показало наличие этих групп микроорганизмов в химусе серебряного карася, судака и окуня. В химусе ельца, плотвы и щуки представители филума Euryarchaeota не были зарегистрированы.

Амплификация с использованием специфичных праймеров на классы Alphaproteobacteria и Betaproteobacteria показала наличие данных микроорганизмов в химусе серебряного карася. У других мирных рыб эти группы микроорганизмов детектировались единично (в химусе одной особи ельца и у одной особи плотвы). Среди хищных рыб Alphaproteobacteria присутствовали только в химусе щуки, а Betaproteobacteria – только в химусе окуня.

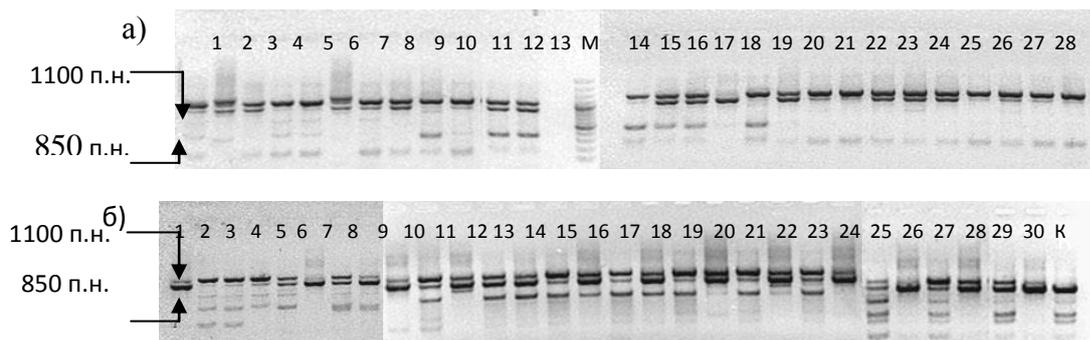


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации на бактериальных консервативных праймерах 500L-1350R некоторых проб кишечника и химуса хищных и мирных рыб оз. Чаны. а) окунь (1-10), щука (11-18), судак (19-28); б) елец (1-8), серебряный карась (9-24), плотва (25-30). М – маркер молекулярного веса, К – отрицательный контроль.

Представители филума Firmicutes у мирных рыб зарегистрированы не были, в то время как у хищных рыб, напротив, выявлено наличие этих групп. У судака данная группа микроорганизмов детектируется при использовании пары праймеров 338F-B-K1R, у щуки и окуня – при использовании пары LGC353F-1542R.

Представители филумов Planctomycetes, Verrucomicrobia и Cyanobacteria присутствовали в химусе как хищных, так и мирных рыб.

Разнообразие микрофлоры кишечника мирных и хищных рыб. При амплификации с использованием архейных консервативных праймеров из кишечника всех особей плотвы, ельца, судака и окуня получены ампликоны, в то время как у щуки они не были детектированы. Стоит отметить, что только у 2 из 4 особей серебряного карася обнаружены представители данной филогенетической группы.

Firmicutes и Verrucomicrobia встречаются практически во всех пробах из кишечника хищных рыб. У мирных рыб эти группы микроорганизмов не были обнаружены, за исключением ельца, для которого Verrucomicrobia были детектированы у одной особи.

В кишечнике у всех особей мирных рыб детектируются представители филума Planctomycetes, у хищных рыб, напротив, данные микроорганизмы не были обнаружены.

Cyanobacteria обнаружены практически у всех особей хищных (за исключением судака) и мирных рыб (рис. 2).

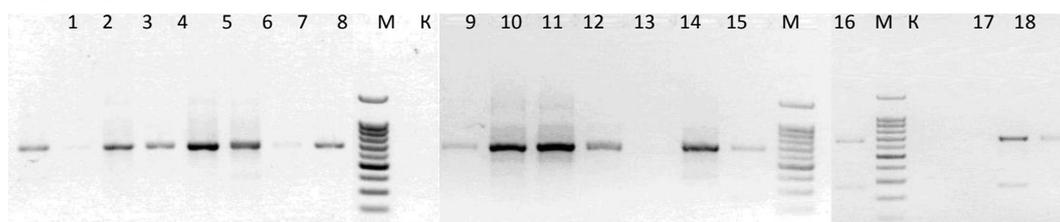


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации с использованием специфичных праймеров на филум Cyanobacteria из проб содержимого кишечника мирных рыб оз. Чаны. Плотва (1-4); елец (5-8); серебряный карась (9-18). М – маркер молекулярного веса, К – отрицательный контроль.

Alphaproteobacteria детектируется в кишечнике серебряного карася, ельца и щуки. Betaproteobacteria детектируется у всех особей хищных и мирных рыб, за исключением щуки.

Многими авторами также отмечается большое разнообразие таксонов бактерий у других пресноводных рыб. Например, в составе микрофлоры кишечника пищеварительного тракта радужной форели доминируют представители класса Gammaproteobacteria (*Citrobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*) и Betaproteobacteria, а также грамположительные бактерии с низким содержанием G + C пар (Austin, 2002).

Степень сходства микрофлоры химуса и микрофлоры кишечника мирных и хищных рыб. Для характеристики степени сходства таксономического состава микрофлоры химуса и микрофлоры кишечника для мирных и хищных рыб рассчитан коэффициент Серенсена

(таблица). Коэффициент сходства измеряется от 0 (нет сходства) до 1 (полное сходство) (Мэгарран, 1992).

Таблица. Значения коэффициента Серенсена для мирных и хищных рыб

| Виды рыб | Плотва | Елец | Судак | Щука | Окунь |
|----------------------|--------|------|-------|------|-------|
| Микрофлора химуса | | | | | |
| Серебряный карась | 0,73 | 0,92 | 0,67 | 0,50 | 0,62 |
| Плотва | | 0,80 | 0,67 | 0,75 | 0,80 |
| Елец | | | 0,50 | 0,55 | 0,67 |
| Судак | | | | 0,55 | 0,67 |
| Щука | | | | | 0,73 |
| Микрофлора кишечника | | | | | |
| Серебряный карась | 0,60 | 0,57 | 0,44 | 0,20 | 0,36 |
| Плотва | | 0,71 | 0,67 | 0,40 | 0,55 |
| Елец | | | 0,57 | 0,50 | 0,67 |
| Судак | | | | 0,20 | 0,67 |
| Щука | | | | | 0,55 |

При сравнении состава микрофлоры химуса мирных рыб между собой нами были получены значения коэффициента Серенсена в диапазоне от 0,73 до 0,92, что свидетельствует о достаточно высокой степени сходства. Видимо, это связано с тем, что в питании всех мирных рыб присутствует детрит. Среди хищных рыб установлена меньшая степень сходства в составе микрофлоры химуса (0,55–0,73).

Подобные закономерности прослеживаются и при анализе степени сходства в таксономическом составе микрофлоры кишечника мирных и хищных рыб. Для мирных рыб сходство выше (0,57–0,71), для хищных рыб – ниже (0,20–0,67).

Наибольшие различия отмечаются в составе микрофлоры кишечника у серебряного карася, ельца и плотвы с окунем, щукой и судаком (среднее значение коэффициента Серенсена – 0,49). Однако, для тех же видов рыб состав микрофлоры химуса имеет большее сходство (среднее значение коэффициента Серенсена – 0,63).

Наши данные согласуются со сведениями, полученными другими авторами, показавшими, что наибольшие различия прослеживаются в составе микрофлоры планктофагов по сравнению с рыбами других экологических групп вместе взятыми, а также с хищниками и растительноядными рыбами. (Извекова и др., 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано разнообразие 7 филумов бактерий в кишечнике и химусе исследуемых видов рыб. Использование специфичных генов для идентификации отдельных филумов бактерий показало их неодинаковое присутствие у хищных и мирных рыб. Использование разных пар праймеров на один и тот же филум продемонстрировало его неоднородность как для хищных, так и мирных рыб. На основе расчетов по коэффициенту Серенсена выявлены различия в составе микрофлоры кишечника и химуса мирных и хищных рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Белькова Н.Л. Методики для практических работ по большому практикуму: введение в молекулярную экологию микроорганизмов. Иркутск, 2008. 42 с.
2. Извекова Г.И. Функциональное значение микрофлоры кишечника для рыб и паразитирующих в их пищеварительном тракте цестод// Успехи современной биологии. 2008. Т. 128. №5. С. 507–517.
3. Извекова Г.И., Извеков Е.И., Плотников А.О. Симбионтная микрофлора рыб разных экологических групп// Известия РАН. Сер. биологическая. 2007. №6. С. 1 – 10.
4. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. М.: Мир, 1992. 184 с.
5. Пульсирующее озеро Чаны. Л.: Наука, 1982. 304 с.
6. Шивокене Я. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас, 1989. 223 с.
7. Austin B. The bacterial microflora of fish// The ScientificWorldJOURNAL. – 2002. – № 2. P. 558-572.

8. Characterization of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal/ E. Ringo, S. Sperstad, R. Myklebust, et al.// Aquaculture. 2006. P. 829–841.
9. Mondal S., Roy T., Ray A. K. Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of Bata, *Labeo bata*// Journal of the world aquaculture society. 2010. V. 41. N. 3. P. 369-377.
10. Spanggaard B., Huber I., Nielsen J. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification// Aquaculture. 2000. V. 182. P. 1-15.

THE DIVERSITY OF SYMBIOTIC MICROFLORA INTESTINE IN SEVERAL SPECIES OF FISH IN CHANY LAKE

Kashinskaya Elena, Suhanova Elena, Solovyev Mikhail, Izvekova Galina.

In this study, we used a polymerase chain reaction to identify the intestine and intestinal contents bacterial diversity of fish with different feeding habits. The total DNA of microorganisms was extracted from the intestine and intestinal contents and amplified using group-specific primers of the 16S rRNA gene of bacteria. The profiles of the 16S rRNA gene amplicons were displayed the availability of 7 phylums of bacteria in the intestine and intestinal contents of fish. Significant differences has been shown in the composition of intestinal microflora and intestinal contents of nonpredatory (crucian carp, roach, dace) and predatory fish (pikeperch, perch, pike).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА (*NEOGOBIUS MELANOSTOMUS*) ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ

Т.Б. Ковыршина

Институт биологии южных морей нан украины, г. Севастополь, украина

E-mail: mtk.fam@mail.ru

Среди биомаркеров, позволяющих оценить состояние рыб и среды их обитания, *уровень сывороточного альбумина* является важным диагностическим показателем, широко применяемым для выявления интоксикаций, вызванных различными загрязнителями. Поступление в организм избыточных концентраций ксенобиотиков способствует интенсификации процессов свободнорадикального окисления и, как следствие, повышению содержания продуктов ПОЛ и уровня эндогенной интоксикации. В первом случае взаимодействие белковых аминокислот с продуктами окисления липидов приводит к увеличению отрицательного заряда и конформационным преобразованиям альбумина, во втором – к блокированию или аллостерическим изменениям центров связывания на молекуле белка. В результате этих процессов нарушается транспортная функция альбумина, от чего зависит течение и исход многих интоксикаций, снижается его концентрация (Альбумин сыворотки., 1994; Michelis et al., 2010). В то же время необходимым условием для корректного применения уровня альбумина в качестве биомаркера является анализ пределов его естественной вариабельности в популяциях изучаемых видов.

В связи с этим цель работы состояла в изучении половых, возрастных и сезонных особенностей содержания альбумина в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служил бычок-кругляк (*Neogobius melanostomus* Pallas), отловленный в прибрежье Черного (г. Севастополь, n = 48) и Азовского (г. Щелкино, n = 52) морей в период с 2009 по 2011 гг.

В сыворотке крови определяли концентрацию альбумина (г/л) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Филисит - Диагностика» (Украина). Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что концентрация альбумина в сыворотке крови азовских бычков составляет 16,09 г/л, что в 3 раза больше ($p \leq 0,001$) таковой в сыворотке рыб из Черного моря (5,68 г/л).

Сравнительный анализ содержания альбумина в сыворотке бычка-кругляка разных возрастных групп из Черного моря не обнаружил достоверных отличий, тогда как у азовских бычков наблюдали значительное его снижение у старших рыб по сравнению с 2-х и 3-х летними ($p \leq 0,001$) (Рис. 1). Коэффициент корреляции между возрастом рыб и концентрацией альбумина у азовских бычков составил $r = -0,85$.

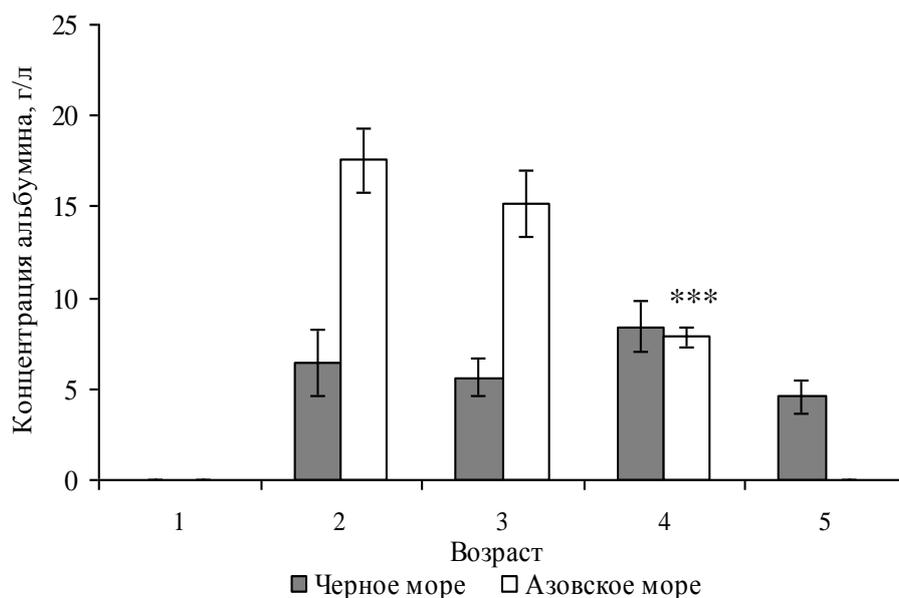


Рис. 1. Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови разновозрастных особей бычка-кругляка из Черного и Азовского морей; * - достоверность различий с 2-х летними рыбами; ** - с 3-х летними.

В то же время уровень альбумина достоверно выше ($p \leq 0,01$) в сыворотке крови 2-х и 3-х годовалых рыб из Азовского моря по сравнению с таковым у соответствующих возрастных групп черноморских бычков, однако имеет сходство у 4-х летних.

Концентрация альбумина в сыворотке крови самок и самцов из обоих морей представлена на рисунке 2.

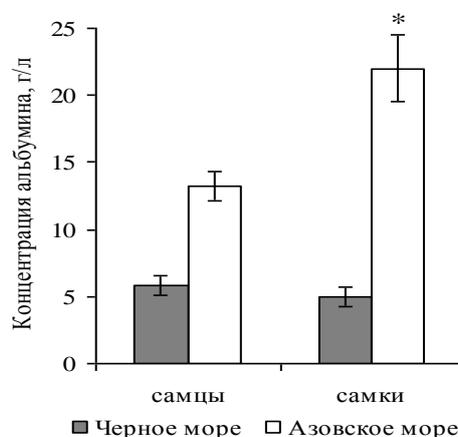


Рис. 2. Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови самок и самцов бычка-кругляка из Черного и Азовского морей; * - достоверность различий.

Содержание альбумина не имело достоверных отличий у разнополых особей черноморских бычков, тогда как у самок азовских рыб превосходило значение соответствующего параметра у самцов почти в 2 раза ($p \leq 0,01$).

В дальнейшем интерес представлял оценить динамику концентрации альбумина в зависимости от репродуктивной активности бычка-кругляка (Рис. 3).

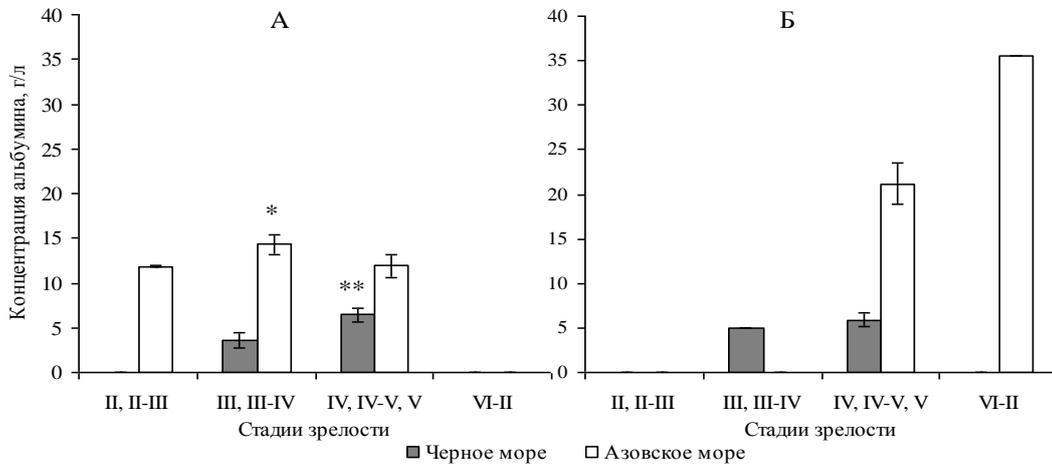


Рис. 3. Концентрация альбумина в сыворотке крови самцов (А) и самок (Б) бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в зависимости от стадии зрелости гонад; * - достоверность различий с II, II-III стадией зрелости ** - с III, III-IV. II, II-III – стадия покоя; III, III-IV – преднерестовая стадия IV, IV-V, V – нерест; VI-II – посленерестовая стадия

Уровень альбумина в сыворотке крови черноморских самцов выше ($p \leq 0,05$) в нерестовый период по сравнению с преднерестовым. У азовских самцов концентрация этого белка достоверно увеличивалась ($p \leq 0,05$) в преднерестовый период относительно стадии покоя.

Содержание альбумина в сыворотке крови самок бычка-кругляка из Черного моря практически одинаково в период созревания гонад и нерестовый период. У самок азовских рыб значение исследуемого параметра значительно выше в посленерестовый период по сравнению с нерестом.

Уровень альбумина в сыворотке черноморских бычков в меньшей степени зависел от сезонных изменений, чем у рыб, обитающих в прибрежье Азовского моря. Концентрация альбумина достоверно выше в сыворотке азовских бычков летом по сравнению с весенним ($p \leq 0,001$) и осенним ($p \leq 0,001$) периодами (Рис.4).

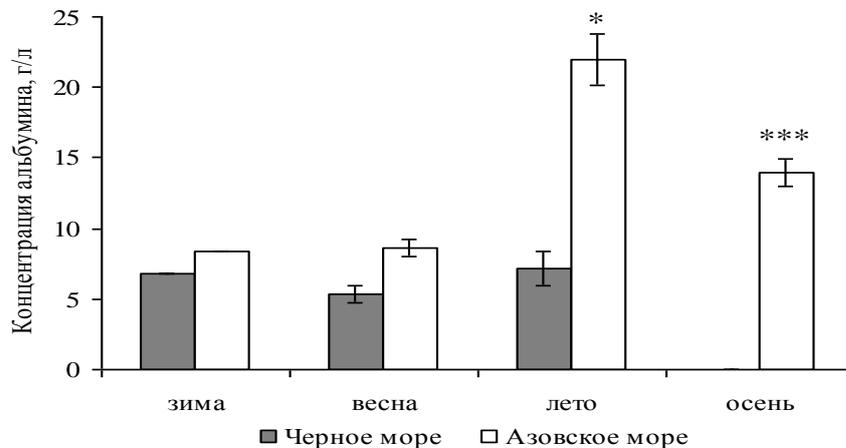


Рис. 4. Концентрация альбумина (г/л) в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей в разные сезоны года; * - достоверность различий с весенним сезоном; ** - с летним сезоном.

Таким образом, нами были установлены половые, возрастные и сезонные особенности содержания альбумина в сыворотке крови бычка-кругляка из Черного и Азовского морей.

Альбумин является важным многофункциональным белком сыворотки крови. Он участвует в пластическом обмене у рыб, поддерживает коллоидно-осмотическое давление крови, образует растворимые комплексы со многими веществами (липиды, гормоны, витамины, билирубин и т.д.) и транспортирует их к местам утилизации (Альбумин сыворотки..., 1994).

В наших исследованиях содержание альбумина в 3 раза выше в сыворотке азовских рыб по сравнению с черноморскими, что может зависеть от особенностей гидрохимических характеристик среды обитания (соленость, БПК₅), пищевых ресурсов, антропогенной нагрузки в районах добычи рыб. Так, в сравнительных исследованиях, проведенных на морских и речных угрях, было установлено, что средний уровень альбумина в 10 раз выше у рыб, отловленных в морской воде (Лукьяненко, Хабаров, 2005). Существенное влияние на содержание альбумина оказывает рацион питания (MacQueen et al., 2011), что так же объясняет более высокий уровень этого белка в сыворотке бычков, обитающих в богатом пищевыми ресурсами побережье Азовского моря. Кроме того, значительные концентрации ксенобиотиков в бухтах Севастополя способствуют нарушению транспортной функции альбумина, его окислительной модификации и выведению поврежденных молекул из кровяного русла. Другими авторами также установлено снижение уровня альбумина в сыворотке крови рыб, подвергшихся воздействию сточных вод (Kamal, Omar, 2011), эндосульфана (Yekeen, Fawole, 2011) и комплексном загрязнении среды (Скуратовская, Хмеленко, 2012).

Снижение концентрации альбумина было выявлено в сыворотке крови азовских бычков старшей возрастной группы по сравнению с 2-3 летними рыбами ($r = -0,85$), что может быть следствием снижения метаболических превращений в организме, белоксинтезирующей функции печени и транспортной функции альбумина. Последняя снижается за счет накопления среднемолекулярных продуктов распада белков, блокирующих центры связывания на молекуле альбумина.

Как известно, альбумин осуществляет транспорт гормонов, в том числе и половых. В наших исследованиях содержание альбумина в сыворотке самок и самцов черноморских бычков достоверно не различалось. У азовских рыб значение этого параметра достоверно выше у самок, что противоречит данным, полученным Yousefian и сотрудниками (2010).

Наряду с вышеперечисленными факторами физиологический статус организма в значительной степени зависит от сезонных изменений параметров среды, в том числе обеспеченности пищей (Kamal, Omar, 2011) и репродуктивной активности видов (Marco et al., 2011). Концентрация альбумина в сыворотке крови самцов азовских рыб достоверно выше в преднерестовый период по сравнению с периодом покоя, что может быть обусловлено активным транспортом компонентов, необходимых для созревания гонад. У самцов черноморских бычков тенденция противоположная - содержание альбумина выше во время нереста, чем в преднерестовый период. Выявленная особенность может быть связана с началом активного питания этого вида, который приходится на конец весны – начало лета и совпадает с нерестом. В то же время концентрация альбумина в сыворотке крови азовских бычков летом существенно выше соответствующих значений у черноморских рыб. Наиболее вероятной причиной этого является богатая кормовая база и высокий уровень эвтрофикации Азовского моря в теплое время года, что было показано и другими авторами (Kopp et al., 2010).

Таким образом, при использовании концентрации сывороточного альбумина в качестве биомаркера необходимо учитывать пол и возраст рыб, а также естественные метаболические флуктуации, связанные с репродуктивной активностью, сезонными изменениями параметров среды и обеспеченностью пищей в течение года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова // М.: ИРИУС, 1994. 226 с.
2. Лукьяненко В.И., Хабаров М.В. Альбуминовая система сыворотки крови разных по экологии видов осетровых рыб. - Ярославль, 2005. 232 с.

3. Скуратовская Е.Н., Хмеленко Т.Э. Экотоксикологический анализ морского ерша *Scorpaena porcus* L. из разных бухт г. Севастополя / III международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биологии, экологии и химии». Запорожье: ЗНУ, 2012. С. 277 – 279.
4. Kamal S.M., Omar W.A. () Effect of different stocking densities on hematological and biochemical parameters of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* fingerlings // Life Science Journal. 2011. Vol. 8 (4). P. 580 – 586.
5. Kopp R., Palikova M., Navratil S., Kubicek Z., Zikova A., Mares J. Modulation of biochemical and hematological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to toxic cyanobacterial water bloom // Acta Vet. Brno. 2010. Vol. 79. P. 135 – 146.
6. MacQueen H.A., Wassif W.S., Walker I., Sadler D.A., Evans K. Age-related biomarkers can be modulated by diet in the rat // Food and Nutrition Sciences. 2011. Vol. 2. P. 884 – 890.
7. Marco P.D., Priori A., Finioia M.G., Petochi T., Longobardi A., Donadelli V., Marino G. Assessment of blood chemistry reference values for cultured sturgeon hybrids (*Acipenser naecarii* female X *Acipenser baerii* male) // J. Appl. Ichthyol. 2011. Vol. 27. P. 584 - 590.
8. Michelis R., Kristal B., Snitkovsky T., Sela S. Oxidative modifications impair albumin quantification // Biochem. and Biophys. Res. Communications. 2010. Vol. 401. P. 137 – 142.
9. Yekeen T.A., Fawole O.O. Toxic effects of endosulfan on haematological and biochemical indices of *Clarias gariepinus* // African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10 (64). P. 14090 – 14096.
10. Yousefian M., Amiri M.S., Hedayatifard M., Dehpour A.A., Fazli H., Ghiaci M., Farabi S.V., Najafpour S.H. Serum biochemical parameter of male and female rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) cultured in Haraz River, Iran // World Journal of Fish and Marine Sciences. 2010. Vol. 2 (6). P. 513 – 518.

COMPARATIVE STUDY OF SERUM ALBUMIN LEVELS IN ROUND GOBY *NEOGOBIUS MELANOSTOMUS* FROM BLACK SEA AND AZOV SEA

T. B. Kovyrshina

Concentration of blood serum albumin of the round goby *Neogobius melanostomus* caught in Black Sea and Azov Sea was studied in relation to age, sex, maturation stage and season. Albumin level variations in fish serum have been shown. Albumin concentration in fish serum depended on fish physiological status, age, season and geographical location.

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НА ПИГМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ИЗ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ВОДОЕМОВ Г. ТЮМЕНИ

Корнилов А.Л.¹, Петухова Г.А.¹, Коваленко А.И.²

¹ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия (625003, Тюмень, ул. Семакова, 10), e-mail: lelik_tgu@mail.ru

²ФГУП «Госрыбцентр», Тюмень, Россия (625023, Тюмень, ул. Одесская, 33), e-mail: g-r-c@mail.ru

Фотосинтез является одним из наиболее чувствительных процессов к действию чужеродных веществ [1]. Токсиканты, подавляя фотосинтетический аппарат, изменяют пигментный состав листьев растений. Природа фототоксикантов при этом может быть различной [7]. При действии токсикантов быстро разрушаются хлорофилл А и каротиноиды, меньше — хлорофилл В [5].

Окружающая среда в городе Тюмени испытывает постоянное мощное и прогрессирующее воздействие со стороны промышленности, энергетики и транспорта [2]. Приводная и водная растительность является хорошим биоиндикатором состояния окружающей среды.

Целью работы являлась отслеживание за изменениями концентраций пигментов фотосинтеза (ПФ) растений в зависимости от состояния водоемов г. Тюмени.

Содержание пигментов фотосинтеза – хлорофилла и каротиноидов определяли при помощи спектрофотометра по стандартной методике [8].

Исследования состояния водоемов (4 озера и 2 пруда) проводили по доминантным растениям (клевер ползучий (*Trifolium repens*) и подорожник большой (*Plantago major*)) в

прибрежной зоне (расстояние 1-2 метра от летней межени водоема) и по высшим водным растениям (стрелолист обыкновенный (*Sagittaria sagittifolia*)).

Оз. Муллаши и Кучак находятся за пределами города (около 20 км). На территории этих водоемов устроены базы отдыха, биостанция с прилегающим дачным поселком. Пруд Лесной и озеро Круглое расположены в зеленой части города и тем самым являются зонами отдыха. Вблизи пруда Лесного расположена ТЭЦ-2. Озеро Круглое имеет в качестве источника загрязнения водный транспорт. Пруд Южный расположен в жилом массиве. Озеро Оброчное является водоемом охладителем ТЭЦ-1 и расположено рядом с ней. Через него проходит автомобильная трасса.

Все обследованные водоемы относятся к пресным, мало (оз. Муллаши, Оброчное, Круглое и пр. Лесной) и средне минерализованным (оз. Кучак и пр. Южный). По солевому составу водоемы преимущественно гидрокарбонатно-кальциевые. Один водоем (оз. Муллаши) сульфатно-магниевого. Минимальные значения химических показателей солевого состава, фиксировались в воде озера Муллаши, максимальные - в пр. Южном. Все исследуемые водоемы имеют отклонения гидрохимических показателей от ПДК. Самым благополучным по гидрохимическим показателям воды оказался пр. Южный [3,4] и, в связи с этим, был выбран как контрольный водоем.

Состояние пигментной фотосистемы растений позволяет проанализировать их ответные реакции на загрязнение водоемов. Система фотосинтеза, как одна из основных систем жизнеобеспечения растений быстро реагирует на любые, даже небольшие изменения среды [4].

В листьях клевера ползучего из четырёх обследуемых водоемов (оз. Муллаши, пр. Лесного, оз. Кучак и Оброчного) отмечено повышение суммарной концентрации ПФ (рис. 1) по отношению к показателям растений из района пр. Южный ($P < 0.05$). Сходные ответные реакции у стрелолиста ($P < 0.05$), произрастающего в исследуемых водоемах. В качестве контроля у стрелолиста использовали растения из оз. Муллаши, в котором встречался стрелолист. Ответные реакции в листьях клевера были более выражены по сравнению со стрелолистом.

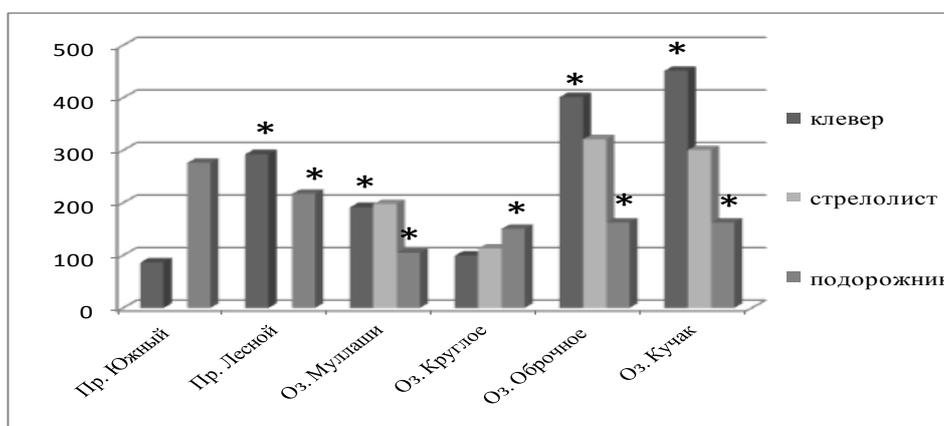


Рис. 1. Суммарные концентрации ПФ в листьях некоторых растений исследуемых водоемов. *- статистически достоверные различия по отношению к пр. Южному, при $P < 0.05$.

Повышение концентрации пигментов фотосинтеза может быть связано как с «цветением» воды и повышением содержания таких веществ, как природные фенолы (определялись как нефтепродукты), железо, азот аммонийный, фосфат-ион, а так же с повышенной температурой воды оз. Оброчное (водоем - охладитель ТЭЦ-1), ускоряющей обменные процессы у растений.

Анализ суммарной концентрации ПФ в листьях подорожника показал, что наименьшие её величины были у растений из прибрежных зон оз. Муллаши, Круглое, Оброчное, Кучак и пр. Лесного по отношению к пр. Южному ($P < 0.05$). Следует обратить внимание на разнонаправленность ответных реакций растений. Наряду с повышением суммарных концентраций ПФ клевера и стрелолиста, выявлено снижение изучаемого показателя в листьях подорожника из прибрежных зон одних и тех же водоемов. Это может говорить о разных ответных реакциях этих растений на загрязнение.

Хлорофилл А это основной пигмент фотосинтеза, хлорофилл В – вспомогательный пигмент фотосинтеза, а каротиноиды помимо вспомогательной функции в работе фотопигментного аппарата являются одними из основных компонентов системы антиоксидантной защиты растений [1,5].

Отношение общего числа хлорофиллов А и В к общему числу каротиноидов в образцах клевера из пр. Южный составило 37,74 и оз. Круглое – 42,33, которые оказались меньше подвергнуты загрязнению. Значения отношений общего числа хлорофиллов А и В к общему числу каротиноидов в образцах клевера из оз. Оброчное составляет 165,24 и оз. Кучак – 194,38. Защитные системы клевера из прибрежной зоны оз. Оброчного и Кучак работают в интенсивном состоянии так, как возможно, на растения оказывается негативное влияние. Аналогичные результаты наблюдались и у стрелолиста. Подорожник имеет иную структуру отношений общего числа хлорофиллов А и В к общему числу каротиноидов по исследуемым водоемам (пр. Южный – 118,48, а у оз. Муллаши – 45,28; оз. Круглое – 65,34; оз. Оброчное – 67,26; оз. Кучак – 67,78). Наименьшее количество каротиноидов у растений с пр. Южный, а наибольшее у растений с оз. Муллаши. Вследствие чего, негативное воздействие подорожник больше испытывает на оз. Муллаши, чем на пр. Южном.

Исходя из того, что концентрации хлорофиллов А, В и каротиноидов в листьях клевера из прибрежной зоны оз. Оброчного и оз. Кучак (рис.2) были наиболее высокими ($P < 0.05$) из изучаемых образцов, что возможно связано с ответной реакцией растений на интенсивное загрязнение вод из озёр Кучак и Оброчное главными ионами.

Нужно отметить, что наибольший вклад вносят в увеличение количества пигментов хлорофилл А и каротиноиды. Обращает внимание тот факт, что концентрации хлорофилла А и каротиноидов различаются у растений из районов оз. Кучак и Оброчное. В оз. Кучак заметное увеличение концентрации хлорофилла А над каротиноидами, что возможно связано с потребностями в большом количестве органических веществ для производства энергии растениями в условиях загрязнения.

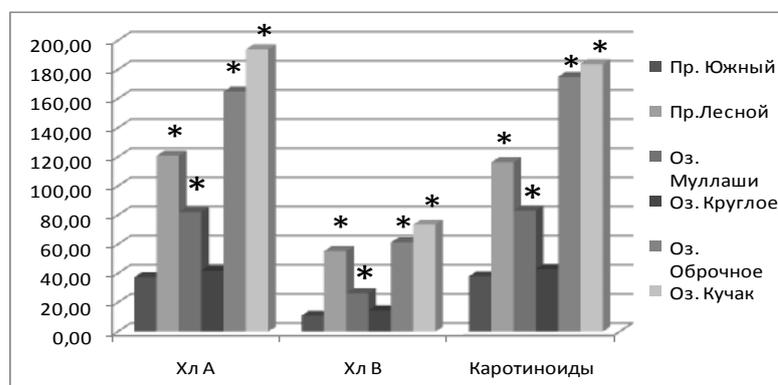


Рис. 2. Концентрация пигментов фотосинтеза в листьях клевера из районов исследования. * - статистически достоверные различия по отношению к пр. Южному, при $P < 0.05$.

В листьях клевера из четырёх обследованных водоемов (оз. Муллаши, Оброчное, Кучак и пр. Лесной) концентрация хлорофилла В является высокой ($P < 0.05$) по отношению к показателям растений из района пр. Южного.

Увеличения концентраций хлорофиллов А, В и каротиноидов (рис. 3) в листьях стрелолиста обыкновенного из исследуемых районов, аналогичны показателям, которые зарегистрированы у клевера ($P < 0.05$).

Из рисунка 4 видно, что в листьях подорожника большого концентрации хлорофиллов А, В и каротиноидов имели схожую картину изменения с суммарной концентрацией подорожника ($P < 0.05$). Изучение содержания хлорофилла В у подорожника из прибрежных зон озер - Оброчное, Круглое, Кучак и Муллаши, показало, что концентрация пигмента была меньше у растений из районов этих водоемов ($P < 0.05$), чем у растений из прибрежного района пр. Южного.

Концентрации пигментов у растений из районов озер Круглое и Оброчное были одинаковы ($P > 0.05$). Соответственно растения не испытывают энергетического «голода» по

отношению к растениям произрастающим в прибрежной зоне пр. Южный. Следовательно, пигментные системы растений обеспечивают организм необходимыми органическими веществами.

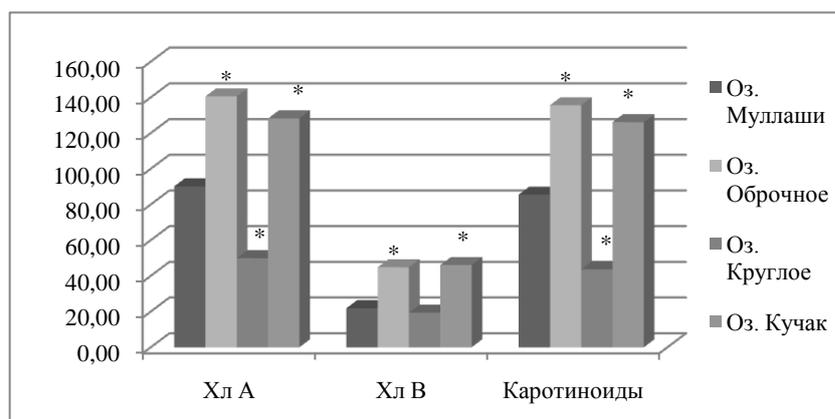


Рис. 3. Концентрация пигментов фотосинтеза в листьях стрелолиста обыкновенного (*Sagittaria sagittifolia*) из исследуемых районов. * - статистически достоверные различия по отношению к оз. Муллаши, при $P < 0.05$.

Проведенные исследования гидрохимических показателей свидетельствуют о том, что каждый из изучаемых водоёмов подвержен различным загрязнениям со стороны человека. Общая концентрация пигментов фотосинтеза в листьях клевера и стрелолиста увеличивается у растений из районов оз. Кучак и Оброчное по сравнению с показателями у этих видов с пр. Южного и оз. Муллаши.

Показано, что наименьшие величины суммарной концентрации пигментов фотосинтеза в листьях подорожника были у растений из прибрежных зон оз. Муллаши, Круглое и Оброчное по отношению к пр. Южный.

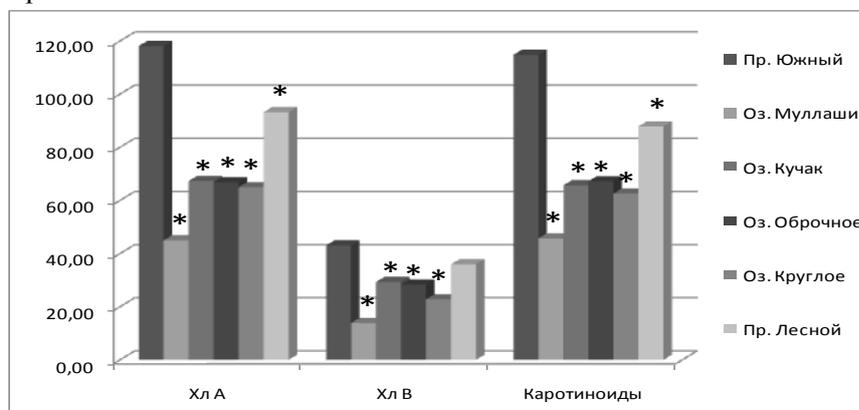


Рис. 4. Концентрация пигментов фотосинтеза в листьях подорожника из районов исследования. *- статистически достоверные различия по отношению к пр. Южному, при $P < 0.05$

Ответные реакции растений имеют разнонаправленный характер. Наряду со снижением суммарных концентраций ПФ клевера и стрелолиста выявлено, увеличение суммарной концентрации ПФ в листьях подорожника из береговой зоны одних и тех же водоёмов. В дальнейших исследованиях необходимо использовать большее количество биоиндикаторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипов В.Г. Устойчивость древесных растений к промышленным газам: учеб. пособие. М.: Высшая Школа, 1983. 174 с.
2. Гусейнов А.Н. Экология города Тюмени: состояние, проблемы. Тюмень: Издательская фирма «Слово», 2001. 176 с.

3. Корнилов А.Л., Петухова Г.А., Коваленко А.И. Ответные биохимические реакции растений из прибрежной зоны водоемов г. Тюмени // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 3. URL: <http://www.science-education.ru/103-6419>.
4. Перечень рыбохозяйственных нормативов предельно-допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО, 1999. 304 с.
5. Полевой В.В. Физиология растений: учеб. пособие. М.: Высшая школа, 1989. 378 с.
6. Рождественский М.И. Отчет о Научно-исследовательской работе по теме "Устройство водоемов г. Тюмени" / М.И. Рождественский, С.П. Никонов, В.Н. Шулаев. Тюмень: СИБРЫБНИИПРОЕКТ, 1991. 81 с.
7. Шлык А.А. Биосинтез и состояние хлорофилла в растении: учеб. пособие / А.А. Шлык, С.Е. Грудникова, С.А. Михайлова. Минск: Наука и техника, 1981. 248 с.
8. Шульгин И.А. Расчет содержания пигментов с помощью номограмм / И.А. Шульгин, А.А. Ничипорович // Хлорофилл. Минск: Наука и техника. 1974. С.127-136.

EFFECT OF POLLUTION ON PIGMENT PLANT FROM COASTAL WATERS TYUMEN

Kornilov A.L.¹, Petuhova G.A.¹, Kovalenko A.I.²

¹Tyumen state university, Tyumen, Russia (625003, Tyumen, Semakova Street, 10), e-mail: lelik_tgu@mail.ru

²Statefishcent, Tyumen, Russia (625023, Tyumen, Odessa Street, 33), e-mail: g-r-c@mail.ru

Concentration of photosynthetic pigments studied the dominant plants of the coastal zone, where water is not the city of Tyumen. Analyzed the hydrochemical properties of water. Change the biochemical parameters of plants from the coastal waters studied due to the influence of industry, energy and transport.

Key words: photosynthesis, biotesting, environment, drive and aquatic vegetation

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТАЦИЙ *DAPHNIA MAGNA* К ЕСТЕСТВЕННЫМ И ИСКУССТВЕННЫМ ФЛУКТУАЦИЯМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ

В.В. Крылов, Е.А. Осипова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, Борок, Россия
e-mail: kryloff@ibiw.yaroslavl.ru

Магнитное поле (МП) – это важный экологический фактор. На протяжении сотен тысяч лет живые организмы эволюционировали на фоне естественного геомагнитного поля (ГМП). Однако, за последнее столетие значительно увеличивается интенсивность антропогенной магнитной нагрузки на естественные экосистемы. Множество экспериментов показывают, что даже незначительные изменения интенсивности магнитного поля приводят к различным биологическим эффектам. Несмотря на активное изучение магнитобиологических эффектов, остается неизученной способность организма адаптироваться к изменениям магнитного фона.

Для исследования таких адаптаций нами были проведены эксперименты с *Daphnia magna* Straus. Чтобы ответить на вопрос, может ли лабораторная популяция приспособиться к изменениям ГМП, мы использовали инвертированное магнитное поле Земли с напряженностью $\approx 52 \mu\text{T}$. Для исследования адаптаций к антропогенному магнитному загрязнению, в качестве действующего фактора использовали переменное МП с частотой 240 Гц (4 гармоника промышленной частоты 60 Гц для Северной Америки) и напряженностью $1.6 \mu\text{T}$.

Эксперименты проходили в два этапа. Первый – непрерывное действие фактора на *D. magna* в течение восьми поколений. При этом отбор особей следующего поколения был искусственным и случайным, синхронно велась контрольная линия. Второй – выявление адаптивных изменений в линии *D. magna*, которая экспонировалась в исследуемом факторе. При этом молодь из каждой контрольной и экспериментальной линии случайным образом помещали в 14 стаканов содержащих 250 мл чистой среды по 10 особей в каждый. 7 стаканов находилось в контрольных условиях, другие 7 стаканов экспонировались в том же факторе, который использовался на первой стадии эксперимента. На этом этапе тестирования молодь развивалась до дефинитивного состояния, при этом рассматривалось два варианта: «контроль» и «поле». Затем, перед началом продукции потомства, самок из каждого варианта делили на две равные группы. Одна группа помещалась в действующий фактор, другая оставалась в контроле.

Таким образом, во время репродуктивного периода, рассматривалось уже 4 варианта, которые были названы КК (контроль-контроль), КП (контроль-поле), ПК (поле-контроль), ПП (поле-поле). Первая буква в сокращении показывает, в каких условиях происходило развитие и созревание дафний, вторая – соответствует условиям, в которых происходили выметы потомства. Во время первого этапа экспериментов оценивали общую численность, биомассу и размеры дафний в поколениях. Во время второго этапа экспериментов оценивали продолжительность жизни рачков, день появления первого потомства, размеры самок в день появления первого потомства, количество и размеры потомства в пяти первых выводках.

После культивирования дафний в инвертированном ГМП на протяжении 8 поколений, наблюдали достоверное снижение производимого потомства по сравнению с контрольной линией (Рис. 1).

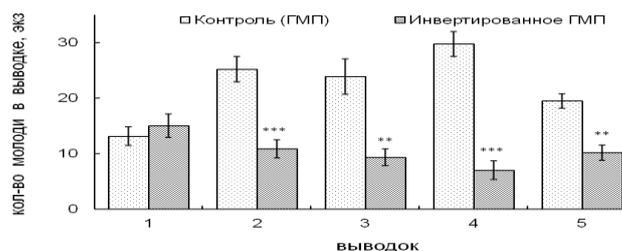


Рис. 1. Среднее количество молоди в выводках. Здесь и на всех последующих рисунках вертикальные планки соответствуют ошибке среднего. Здесь, на рисунке 2 и в таблице 1 звездочками обозначены достоверные отличия от контроля согласно критерию Даннета (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$).

Была также выявлена тенденция к снижению размеров производимого потомства от выводка к выводку (рис. 2).

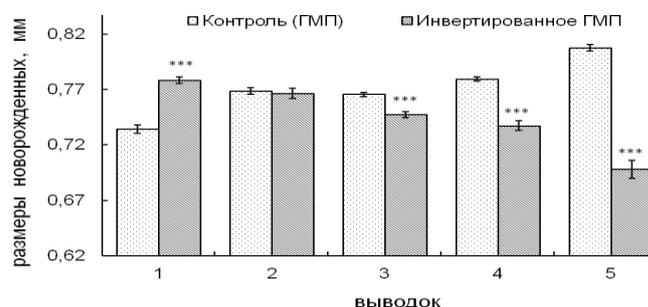


Рис. 2. Средние размеры тела новорожденных в выводках.

Наблюдали снижение общей продолжительности жизни и размеров самок, а также значительную задержку, в среднем на 2 дня, в появлении первого потомства (табл. 1). В целом, действие инвертированного ГМП на дафний в течение 8 поколений приводило к ухудшению исследуемых показателей, то есть заметных адаптаций к изменению направления ГМП обнаружено не было.

Таблица 1. Результаты, полученные в экспериментах с инвертированным ГМП. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего.

| Вариант | День появления первого потомства | Нежизнеспособное потомство, % | Размеры производителей, мм | Продолжительность жизни производителей, сутки |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---|
| Контроль (ГМП) | 8.33 ± 0.30 | 0.92 ± 0.25 | 3.47 ± 0.05 | 67.07 ± 1.32 |
| Инвертированное ГМП | $10.80 \pm 0.45^{***}$ | 3.34 ± 1.56 | $3.27 \pm 0.06^*$ | $55.89 \pm 0.86^{***}$ |

Иначе обстояло дело в экспериментах с низкочастотным МП. Во время первого этапа экспериментов общая численность дафний в линии, экспонировавшейся в МП, на протяжении 1-5 поколений была ниже, чем в контроле. Позднее, в 6-8 поколениях численность дафний в экспериментальной линии приближалась к контрольным значениям. Биомасса в экспериментальной линии напротив была близка к контрольной в 1 и 2 поколениях, а с 3 по 8 поколение стабилизировалась ниже контрольных значений (рис. 3).

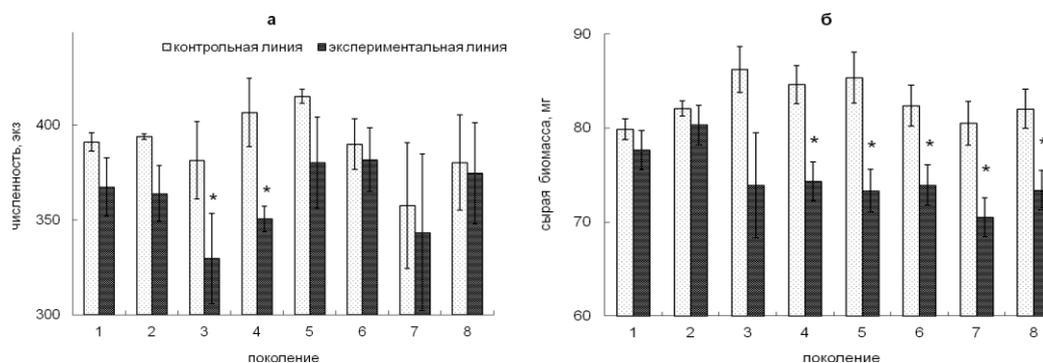


Рис. 3. Динамика изменения численности (а) и биомассы (б) в экспериментальных и контрольных линиях. Звездочками обозначены достоверные отличия от контроля согласно критерию Манна-Уитни ($p < 0.05$).

Действие МП на протяжении 1-5 поколений приводило к большей морфометрической разнородности в экспериментальной линии по сравнению с контролем. Затем, в 6-8 поколениях распределения исследуемых признаков и показатель внутривидового разнообразия приближались к контрольным значениям (рис. 4).

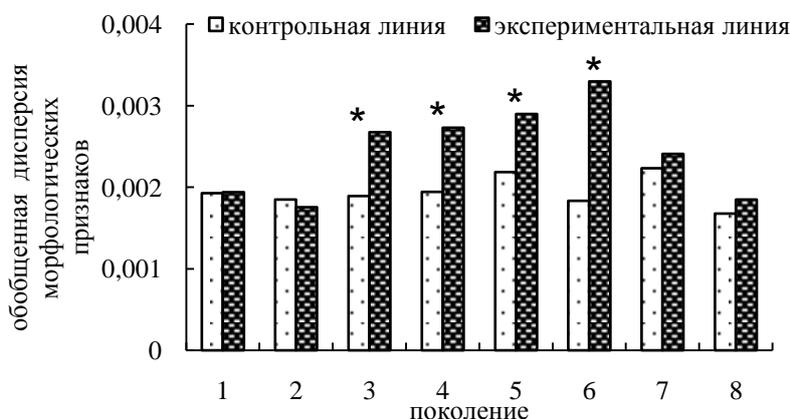


Рис. 4. Динамика изменения обобщенной дисперсии морфологических признаков молоди из первого вывода. Звездочками обозначены достоверные отличия от контроля согласно критерию F Фишера ($p < 0.05$).

Описанные изменения в экспериментальной линии согласуются с описанными ранее адаптивными изменениями в биологических системах при действии различных факторов. Во время изменения условий увеличивается полиморфизм особей в популяции. Флуктуации параметров среды ведут к колебаниям частоты встречаемости признаков в поколениях из-за дестабилизации регуляторных онтогенетических механизмов. Затем популяция приобретает некие адаптивные преимущества, и внутривидовое разнообразие снижается благодаря работе регуляторных механизмов. Дафнии в экспериментальной линии проходили стадию адаптивных изменений в ответ на действие МП. Эти изменения характеризовались увеличением морфологического разнообразия по сравнению с контролем на начальном этапе. Затем, вероятно, уже модифицированная линия, на уровне 6-8 поколений характеризовалась сходными с контролем значениями обобщенной дисперсии. При этом размерные показатели производимого потомства, а, следовательно, и общая биомасса были стабильно ниже контроля при несущественной разнице в численности.

Таблица 2. Многофакторный дисперсионный анализ влияния условий (контроль и МП) на размеры новорожденных рачков десятого поколения (***P<0.001).

| Источник вариации | Ст. св. | Ср. квадрат | F |
|--|---------|-------------|----------|
| [1] условия содержания в течение 8 поколений (1 этап эксперимента) | 1 | 0.862 | 121.6*** |
| [2] условия созревания 9-го поколения дафний | 1 | 0.013 | 1.8 |
| [3] условия во время репродуктивного периода 9-го поколения дафний | 1 | 0.011 | 1.5 |
| Взаимодействие [1]x[2] | 1 | 0.002 | 0.2 |
| Взаимодействие [1]x[3] | 1 | 0.501 | 71.3*** |
| Взаимодействие [2]x[3] | 1 | 0.014 | 2.0 |
| Взаимодействие [1]x[2]x[3] | 1 | 0.003 | 0.4 |
| Внутри повторностей [1]x[2]x[3] | 7971 | 0.005 | 0.7 |

Обнаружение адаптивной значимости описанных изменений было проведено на втором этапе экспериментов. Для оценки влияния условий содержания дафний на протяжении 8 поколений, условий при созревании 9 поколения рачков, условий во время репродуктивного периода и взаимодействия этих факторов на размеры новорожденных потомков (10 поколение) до первой линьки, был проведён многофакторный дисперсионный анализ (Табл. 2). Показано, что на размеры новорожденных влияли условия содержания рачков в течение 8 поколений. У самок из экспериментальной линии рождались более крупные особи. Длительное действие МП приводило к изменениям, аналогичным тем, что наблюдаются в природе при действии неблагоприятных факторов. Кроме того, было обнаружено влияние взаимодействия условий содержания в течение 8 поколений и условий во время репродуктивного периода 9 поколения рачков на размеры новорожденных. Рачки из контрольной линии производили крупное потомство в контрольных условиях, но более мелкое, если во время репродуктивного периода на них действовали МП. Дафнии из линии, которая на протяжении 8 поколений развивалась в МП, напротив, производили крупное потомство в условиях действия МП и более мелкое, если репродукция проходила в контрольных условиях (Табл. 3).

Действие МП на самок из контрольной линии во время репродуктивного периода приводило к увеличению доли мертворожденных потомков. У самок из экспериментальной линии доля мертворожденных особей напротив, была ниже, если производители во время репродуктивного периода находились в условиях действия МП.

Биологически более качественное потомство рождалось в тех условиях, в которых рачки жили на протяжении восьми поколений. Внутри партеногенетической линии дафний происходили физиологические приспособления (материнский эффект), в ответ на действие слабого низкочастотного МП. При этом адаптивный процесс проходил через увеличение внутрипопуляционного разнообразия.

Таблица 3. Размеры новорожденных рачков в пяти первых выводках. Здесь и в таблице 4 достоверные отличия для каждого сравнения при использовании поправки Бонферрони ($p < 0.008$) обозначены звездочками.

| Вариант | Длина тела, мм | n | p-level | | |
|-------------------------|----------------|-----|---------|---------|---------|
| | | | КК | КП | ПК |
| Контрольные линии | | | | | |
| КК | 0.863 ± 0.003 | 922 | – | – | – |
| КП | 0.841 ± 0.003 | 992 | <0.001* | – | – |
| ПК | 0.853 ± 0.003 | 986 | <0.01 | <0.001* | – |
| ПП | 0.842 ± 0.004 | 903 | <0.001* | >0.05 | <0.01* |
| Экспериментальные линии | | | | | |
| КК | 0,864 ± 0.003 | 883 | – | – | – |
| КП | 0,879 ± 0.003 | 859 | <0.001* | – | – |
| ПК | 0,856 ± 0.003 | 873 | <0.05 | <0.001* | – |
| ПП | 0,882 ± 0.004 | 865 | <0.001* | >0.05 | <0.001* |

Таблица 4. Количество нежизнеспособного потомства в пяти первых выводках.

| Вариант | Нежизнеспособное потомство, % | n | КК | p-level КП | ПК |
|-------------------------|-------------------------------|------|---------|------------|---------|
| Контрольные линии | | | | | |
| КК | 1.119 | 6791 | – | – | – |
| КП | 1.899 | 7163 | <0.001* | – | – |
| ПК | 0.913 | 6792 | >0.05 | <0.001* | – |
| ПП | 2.154 | 6684 | <0.001* | >0.05 | <0.001* |
| Экспериментальные линии | | | | | |
| КК | 1.664 | 9015 | – | – | – |
| КП | 1.123 | 8372 | <0.001* | – | – |
| ПК | 2.008 | 8816 | >0.05 | <0.001* | – |
| ПП | 0.699 | 8588 | <0.001* | <0.01 | <0.001* |

Восьми поколений в инвертированном ГМП недостаточно для проявления подобных адаптаций. Это связано с тем, что ГМП – длительно существующий естественный фактор, интенсивность которого выше исследованного низкочастотного МП. Кроме того, механизмы влияния переменных и постоянных МП на биологические системы могут быть различными. Результаты исследования могут использоваться при оценке влияния МП на экосистемы и при работе с лабораторными животными, культивируемыми в МП лабораторного оборудования.

Авторы благодарят И.В. Болотовскую за помощь. Работа выполнена при поддержке РФФИ грант № 11-04-01252-а.

THE STUDY OF ADAPTATIONS IN *DAPHNIA MAGNA* TO NATURAL AND ARTIFICIAL FLUCTUATIONS OF MAGNETIC FIELD

V.V. Krylov, E.A. Osipova

Processes of physiological adaptation to the impact of alternating and static magnetic fields were studied. The process of adaptation passed through the increase of phenotypic variation.

УСТОЙЧИВОСТЬ СЕМЯН ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Е.Г. Крылова

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова РАН, Борок, Россия
e-mail: panova@biw.yaroslavl.ru*

Загрязнение водной среды тяжелыми металлами (ТМ) является одним из наиболее распространенных видов антропогенного воздействия. Многие ТМ при концентрациях, превышающих физиологические потребности растений, проявляют токсические свойства, поэтому рассматриваются как стрессовый фактор (Косицин, Алексеева-Попова, 1983; Малева и др., 2004). Уровень устойчивости при нарастающем действии стрессора зависит от видовых особенностей растений и от режима воздействий (Таланова и др. 2001). По степени токсичности никель и медь среди ТМ занимают одно из ведущих мест. Исследований, касающихся изучения воздействия ТМ на прорастание семян водных растений, немного (Лапиров, 2008; Крылова, 2010). В связи с этим определение устойчивости семян этой группы растений к действию солей никеля и меди представляет определенный интерес.

Нами исследовано влияние растворов $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ на семена частухи подорожниковой (*Alisma plantago-aquatica* L.), сусака зонтичного (*Butomus umbellatus* L.), камыша озерного (*Scirpus lacustris* L.) – гелофитов, обычных в прибрежной зоне и на влажных берегах и поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) – гелогигрофита, встречающегося на мелководьях и периодически осушаемых берегах.

Семена собирали в августе-сентябре в Ярославской обл. на увлажненных побережьях малых рек Ильдь и Латка. Затем, после холодной влажной стратификации в течение 4–5 мес., семена по 25 шт. проращивали в люминостате в чашках Петри при температуре 20–25° С на

фильтровальной бумаге, смоченной растворами ТМ в разных концентрациях (1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 мг/л). Концентрации выбирали по рекомендации специалистов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН и готовили на дистиллированной воде. Высокие концентрации использовали для выявления предела токсичности никеля и меди для прорастания семян (т.е., той концентрации, при превышении которой семена не прорастают). Эксперимент проводили 1 раз, повторность опытов трехкратная, освещенность 3200 лк, фотопериод 9/15 (свет: темнота). Длительность эксперимента 15 суток. Контроль – дистиллированная вода. Определяли время (сут.) от начала эксперимента до проклевывания корешком покровов семени (лаг-время), время (сут.), в течение которого семена прорастали (период прорастания) и количество проросших семян (%) в конце эксперимента (лабораторная всхожесть). Статистическую обработку данных проводили с помощью описательной статистики. Данные представлены в виде средних и их стандартных отклонений.

Влияние сульфата никеля на прорастание семян.

Дружное проклевывание корешком покровов у семян всех видов свидетельствует об их нормальном дозревании и способности к прорастанию. Период прорастания был более растянут у камыша и поручейника (табл. 1). Лабораторная всхожесть у всех видов была выше или одинакова с контрольными значениями при низких концентрациях солей сульфата никеля. Наши данные для семян водных растений совпадают с имеющимися в литературе сведениями о стимуляции растворами никеля в низких концентрациях процессов прорастания семян (Mischra, Kar, 1974).

Таблица 1. Основные показатели прорастания семян под влиянием сульфата никеля

| Концентрация металла, мг/л | Лag-время, сут. | Период прорастания, сут | Лабораторная всхожесть,% |
|----------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------|
| Частуха подорожниковая | | | |
| Контроль | 2 | 5 | 65,2±4,6 |
| 1 | 2 | 4 | 84,0±10,6 |
| 10 | 2 | 4 | 85,3±12,2 |
| 25 | 2 | 4 | 76,0±12,0 |
| 50 | 2 | 4 | 84,0±17,4 |
| 100 | 2 | 5 | 76,0±6,9 |
| 250 | 3 | 8 | 66,7±26,3 |
| 500 | 3 | 8 | 34,7±30,0 |
| Сусак зонтичный | | | |
| Контроль | 2 | 7 | 45,3±6,1 |
| 1 | 2 | 8 | 56,0±17,4 |
| 10 | 2 | 6 | 20,0±4,0 |
| 25 | 3 | 6 | 14,7±4,6 |
| 50 | 2 | 5 | 33,3±12,1 |
| 100 | 2 | 8 | 12,0±4,0 |
| 250 | 2 | 8 | 9,3±6,1 |
| 500 | 3 | 2 | 2,7±2,3 |
| Камыш озерный | | | |
| Контроль | 4 | 12 | 58,7±12,8 |
| 1 | 5 | 12 | 58,7±12,3 |
| 10 | 4 | 12 | 61,3±12,6 |
| 25 | 5 | 12 | 46,7±10,0 |
| 50 | 4 | 12 | 37,3±10,2 |
| 100 | 5 | 12 | 32,7±6,1 |
| 250 | 4 | 12 | 27,3±9,3 |
| 500 | 5 | 12 | 24,0±6,9 |
| Поручейник широколистный | | | |
| Контроль | 3 | 12 | 33,3±4,8 |
| 1 | 3 | 11 | 36,0±4,0 |
| 10 | 3 | 12 | 44,0±4,0 |
| 25 | 3 | 12 | 32,0±4,6 |
| 50 | 3 | 12 | 29,3±1,3 |
| 100 | 5 | 8 | 13,3±1,3 |
| 250 | 8 | 8 | 1,3±1,3 |
| 500 | 8 | 8 | 1,3±1,3 |

Устойчивость прорастания семян к дальнейшему повышению концентрации соли никеля, по-видимому, является видоспецифичной. Наиболее устойчивы семена частухи и камыша – их лабораторная всхожесть снижалась при самых высоких из исследуемых концентраций в среднем на 50%. Однако и это снижение происходило по-разному: последовательно у камыша и скачкообразно у частухи. Уменьшение токсичности никеля при достаточно высоких концентрациях, например, повышение лабораторной всхожести у частухи при 50 мг/л, могло быть связано с образованием комплексов с низкомолекулярными соединениями в клетке, как одним из механизмов защиты от действия ТМ. Семена сусака и поручейника оказались более чувствительны к действию соли никеля – при концентрациях 100 мг/л и выше происходило значительное снижение лабораторной всхожести. Данные по динамике прорастания показали, что основная масса семян частухи и сусака проросла к 4-5 суткам, поручейника и камыша к 8–9-м суткам.

При этом сходным с контрольным процесс прорастания у частухи был при 1-250 мг/л и все, кроме последней концентрации, стимулировали прорастание, концентрация 500 мг/л – угнетала этот процесс. У сусака ни при одной из исследуемых концентраций не было сходного с контрольным процесса прорастания, концентрации 10-500 мг/л угнетали его. У камыша процесс прорастания был сходен с контрольным при всех концентрациях, 1 и 10 мг/л стимулировали, а 25-500 мг/л угнетали его. У поручейника не было сходного с контрольным процесса прорастания ни при одной из исследуемых концентраций.

Однако предела токсичности сульфата никеля для семян исследуемых видов не обнаружено.

Влияние сульфата меди на прорастание семян.

Семена частухи и камыша проросли дружно, семена поручейника проросли значительно позже при 100 и не проросли при 250 и 500 мг/л. Период прорастания также более растянут у камыша и поручейника (табл. 2).

Таблица 2. Основные показатели прорастания семян под влиянием сульфата меди

| Концентрация металла, мг/л | Лаг-время, сут. | Период прорастания, сут | Лабораторная всхожесть, % |
|----------------------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|
| Частуха подорожниковая | | | |
| Контроль | 2 | 5 | 93,3±8,3 |
| 1 | 2 | 6 | 96,0±4,0 |
| 10 | 3 | 7 | 69,3±25,7 |
| 25 | 3 | 7 | 91,3±2,3 |
| 50 | 3 | 6 | 21,3±14,0 |
| 100 | 3 | 6 | 18,7±16,9 |
| 250 | 3 | 5 | 14,7±12,8 |
| 500 | 3 | 4 | 17,3±12,0 |
| Камыш озерный | | | |
| Контроль | 4 | 12 | 58,7±12,8 |
| 1 | 5 | 12 | 58,7±8,3 |
| 10 | 5 | 12 | 56,0±10,6 |
| 25 | 4 | 12 | 46,7±14,0 |
| 50 | 5 | 12 | 38,7±9,2 |
| 100 | 4 | 12 | 33,0±14,3 |
| 250 | 5 | 12 | 23,3±2,3 |
| 500 | 5 | 12 | 21,3±8,3 |
| Поручейник широколистный | | | |
| Контроль | 3 | 13 | 30,0±5,8 |
| 1 | 3 | 13 | 26,7±4,4 |
| 10 | 3 | 13 | 26,7±6,7 |
| 25 | 3 | 13 | 28,3±3,3 |
| 50 | 5 | 13 | 11,7±2,9 |
| 100 | 9 | 13 | 11,7±7,3 |
| 250 | нет | нет | 0 |
| 500 | нет | нет | 0 |

Лабораторная всхожесть у всех видов значительно уменьшалась, начиная с концентрации 50 мг/л. Низкие концентрации сульфата меди стимулировали прорастание у частухи и камыша. В

растворах соли меди у поручейника прорастание проходило равномернее, чем в растворах соли никеля и для этого вида установлен предел токсичности сульфата меди – между 100 и 250 мг/л.

Следует отметить повышение лабораторной всхожести у частухи и камыша при достаточно высоких концентрациях меди. Возможно, это также связано с образованием комплексов с низкомолекулярными соединениями в клетке (Розенцвет и др., 2003).

Данные по динамике прорастания показали, что основная масса семян частухи прорастала к 4-м суткам, а сходным с контрольным этот процесс был только при 1 мг/л. Основная часть семян камыша прорастала к 9-м суткам, при этом процесс прорастания был сходен с контрольным при всех концентрациях. Основная масса семян поручейника прорастала к 10-м суткам, и концентрации меди 10 и 25 мг/л на 5-е – 8-е сутки стимулировали прорастание семян, 50 и 100 мг/л угнетали этот процесс.

Таким образом, сульфат меди оказался токсичнее для прорастания семян у всех изученных видов. Степень токсичности металла определяется эволюционно сформированной устойчивостью вида к воздействию химических элементов, их природой и концентрацией.

Разная реакция семян на действие ТМ, возможно, объясняется различиями в их строении и размерах. Семена поручейника широколистного – дробный ценокарпий, распадающийся на два мерикарпия размером 2 мм, на поверхности которых имеются ребра, и оболочка их экзокарпия оказалась проницаема для молекул ТМ. Семена сусака зонтичного мелкие – 1,8 – 2 мм, поверхность их тонкозернистая. Семенная кожура представлена крупными клетками с утолщенными клеточными стенками, а подстилающие ее клетки внутренней эпидермы мелкие, пористые, возможно, позволяющие ТМ более свободно проникать внутрь семени (Сравнительная..., 1985). Семена камыша озерного сжато-трехгранные, размером до 3-3,5 мм с хорошо развитым эндоспермом и кутикулой в кожуре, плотная оболочка их экзокарпия оказалась непроницаема. Семена частухи подорожниковой размером 3–5 мм с гладкой поверхностью. Клетки семенной кожуры крупные, с утолщенными стенками, полости их заполнены твердым содержимым. Эндокарпий плотный и под эпидермисом залегает пояс крупных воздухоносных клеток, надежно защищающих зародыш от проникновения ТМ.

Поступление ТМ в клетку в значительной степени зависит от скорости переноса солей через поверхностную мембрану клетки. Это может быть фактором, регулирующим поглощение ТМ клетками. Медь, обладая средней степенью поглощения, вызывает нарушение мембранных барьеров клетки, что и послужило причиной значительного токсического эффекта. Избыток меди в мембранах индуцирует окисление липидов, активирует выход кальция, нарушает трансмембранный перенос веществ (Демидчик и др., 2001). Никель обладает слабой степенью поглощения и таких изменений не вызывает. Однако он свободно перемещается и обнаруживается в виде органического комплекса обычно с кислотами.

Устойчивость растений к стрессовым факторам в значительной степени определяется их антиоксидантным статусом, т.е. способностью поддерживать баланс между прооксидантными и антиоксидантными реакциями, протекающими в клетке. Под действием ТМ содержание активных форм кислорода (АФК) в клетке может резко увеличиваться, что приводит к нарушению равновесия и развитию окислительного стресса. В ответ на окислительный стресс в растениях активируется система антиоксидантной защиты (АОС), запускающая работу низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов. Некоторые авторы относят к АОС обогащенные тиолами белки и пептиды (металлотионеины и фитохелатины), которые способны не только связывать избыток ТМ, но и участвовать в нейтрализации токсичных радикалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семена водных растений обладают значительной устойчивостью к действию сульфатов никеля и меди. Сульфат меди оказался токсичнее для прорастания семян у всех изученных видов. Однако предел токсичности для этого процесса установлен только у поручейника широколистного при действии сульфата меди в концентрациях между 100 и 250 мг/л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Демидчик В.В., Соколик А. И., Юрин В.М. Токсичность избытка меди и толерантность к нему растений // Успехи совр. биологии 2001. Т. 121. № 5. С. 511-525.

2. Косицын Н.В., Алексеева-Попова Н.В. Действие тяжелых металлов на растения и механизмы металлоустойчивости (обзор) // Растения в экстремальных условиях минерального питания. Л.: Наука. 1983. С. 5–22.
3. Крылова Е. Г. Токсичность солей никеля и меди для семян и проростков рдеста гребенчатого (*Potamogeton pectinatus* L.), частухи подорожниковой (*Alisma plantago-aquatica* L.), поручейника широколистного (*Sium latifolium* L.) и ситника скученного (*Juncus conglomerates* L.) // Токсикол. вестник. 2010. №1. С.41-44.
4. Лапиров А.Г. Влияние некоторых тяжелых металлов на прорастание семян и развитие проростков *Alisma plantago-aquatica* (*Alismataceae*) и *Bidens tripartita* (*Asteraceae*) // Растительн. ресурсы. 2008. Вып. 4. С. 98-106.
5. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Безель В.С. Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжелыми металлами. Экология. 2004. Т. 4. С. 266–272.
6. Розенцвет О.А., Мурзаева С.В., Гущина И.А. Аккумуляция меди и ее влияние на метаболизм белков, липидов и фотосинтетических пигментов в листьях *Potamogeton perfoliatus* L. // Изв. Самар. НЦРАН. 2003. Т. 5. № 2. С. 305-311.
7. Сравнительная анатомия семян. Однодольные. Л.: Наука. 1985. Т. 1. 317 с.
8. Таланова В.В., Титов А.Ф., Боева Н.П. Влияние возрастающих концентраций тяжелых металлов на рост проростков ячменя и пшеницы // Физиология растений 2001. Т. 48, № 1. С. 119-123.
9. Mishra D., Kar M. Nickel in plant growth and metabolism // Bot. Rev. 1974. V. 40. № 4. P. 395—452.

THE SUSTAINABILITY OF SEED WATER PLANTS TO HEAVY METALS

Ye.G. Krylova

Influence of fluids $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{N}_2\text{O}$ and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ into the seeds of *Alisma plantago-aquatica* L., *Butomus umbellatus* L., *Scirpus lacustris* L. and *Sium latifolium* L. Seeds of aquatic plants have significant resistance to the effects of sulphate of copper and nickel. Copper sulphate was more toxic to germinating seeds have all studied species. However, limit toxicity for this process is only the porucejnika copper sulphate under broad-leaved at concentrations between 100 and 250 mg/l.

АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ЧЕРНОМОРСКИХ МИДИЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM. НА ВОЗДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДЕТЕРГЕНТА (ДСН)

Т.В.Кузнецова¹, В.В.Трусевич², М.П.Кирин, С.В.Холодкевич¹

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Карадагский природный заповедник НАН Украины, Феодосия, Украина
e-mail: kuznetsova_tv@bk.ru

Детергенты (СПАВ) относятся к одним из основных абиотических факторов загрязнения литоральной зоны Черного моря, так как еще с 80-х годов прошлого века уровень их содержания (50-1200 мкг/л) в мелководной зоне вблизи берега уже превышал ПДК (Практическая экология морских регионов. Черное море, 1990). Это не может не сказываться на жизнедеятельности гидробионтов, в частности мидий – основных организмов-фильтраторов литоральной и сублиторальной зон Черного моря. Следует отметить, что мидий часто используют в качестве организмов биоиндикаторов состояния водной среды (Трусевич и др., 2006) в силу их широкого распространения, изученности биологии этих моллюсков, физиологических механизмов их адаптаций к условиям среды обитания (Хлебович, 1981; Бергер, 1986).

Возможности использования характеристик работы сердечно-сосудистой системы (например, ЧСС и вариабельности ритма) бентосных беспозвоночных в качестве потенциального интегрального биомаркера при изучении функционального состояния организма и как показателя биологических эффектов воздействия изменения качества среды на гидробионтов обсуждаются в целом ряде работ (Depledge, Andersen, 1990; Vamber, Depledge, 1997; Kholodkevich et al., 2007, 2008). Такой физиологический биомаркер может быть полезен при определении экологического статуса различных акваторий и оценке риска водным экосистемам.

Анализ параметров работы кардиореспираторной (КРС) системы является одним из важнейших при оценке функционального состояния организма животных.

КРС животных обладает следующими основными характеристиками:

- “быстрый” ответ, так как изменения сердечного ритма связано с деятельностью механизмов нейрогормональной регуляции и является результатом активности различных звеньев вегетативной нервной системы;
- отражает активность других висцеральных систем организма;
- ритмичность, что позволяет легко обрабатывать данные статистическими методами;
- может быть зарегистрирована на целом животном неинвазивными методами;

В настоящей работе представлены результаты экспериментального исследования особенностей физиологических и поведенческих реакций двустворчатых моллюсков Черного моря в норме и при действии на них различных концентраций детергента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методологической основой данного исследования является оценка компенсаторных реакций тест-организмов на стандартизованные тест-воздействия (например, быстрое и кратковременное изменение солености среды с учетом пределов толерантности изучаемого вида), вызывающих осмотический стресс. Объектом исследования служили 2-3-хлетние черноморские мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 55-60 мм, собранные в бухте Казачья (район наиболее чистой воды) г. Севастополя (Крым, Украина) с глубины 1.5-2-х м. Опыты проводили в июне 2011г. в лаборатории корпуса ИнБЮМ (г.Севастополь, Украина), оборудованном системой непрерывной подачи природной воды. Температура воды, поступающей в аквариум с моллюсками, соответствовала температуре воды в море и в течение суток плавно изменялась в диапазоне +21-23° С. Скорость протока воды в аквариуме, объемом 18 л составляла 2,5 л/мин. Опыты проводили без принудительной аэрации аквариумной воды с моллюсками при естественной освещенности. Мидии питались тем, что поступало с природной водой.

После акклимации мидий к условиям аквариумного содержания с постоянным протоком свежей морской воды в течение 4-х дней на створки каждой из 16-ти, одновременно участвующих в эксперименте, в области проекции сердца, неинвазивно приклеивали волоконно-оптические датчики измерения частоты сердечных сокращений (ЧСС), а также основанные на эффекте Холла датчики величины раскрытия створок (ВРС) и регистрировали фоновые показатели этих физиологических и поведенческих характеристик. Кардиоактивность измеряли методом, разработанным ранее (Kholodkevich et al., 2007), а ВРС – путем использования системы, приведенной в (Трусевич и др., 2006; 2007).

В настоящей работе впервые проведено исследование действия различных концентраций детергента на характеристики кардиоактивности и движения створок черноморских мидий.

В предварительных исследованиях была отобрана референтная группа, состоящая из 10 животных, которые, во-первых, демонстрировали устойчивый суточный ритм по этим двум показателям. Как показано ранее (Холодкевич и др., 2009) это является достаточно убедительным свидетельством того, что животные находятся в хорошем функциональном состоянии. Во-вторых, эти же мидии, как было выявлено в предварительной серии экспериментов, давали однотипную реакцию на тест-воздействия, предложенные нами в качестве стандартизованных функциональных нагрузок (Kuznetsova et al., 2008; Холодкевич и др., 2010). В настоящем исследовании применяли воздействие, заключающееся в быстром (в течение нескольких минут) изменении солености воды в аквариуме на 50%. В соответствии с этой методикой тестирования в аквариум с животными добавляли необходимое количество дистиллированной воды (гипоосмотический тест). Через 1 ч после начала такого воздействия соленость воды возвращали к исходному значению путем замещения разбавленной морской воды на воду природной солености. Смена солености осуществлялась быстро, в течение не более 3-х мин. В ответной реакции обращали внимание на время восстановления ($T_{\text{восст.}}$) фонового паттерна ЧСС и ВРС мидий при возвращении начальной солености среды.

В ходе экотоксикологических экспериментов одновременно измеряли движения створок и сердечную активность мидий измеряли при экспозиции моллюсков в протоке природной морской воды, в который перистальтическим насосом из отдельной емкости дозированно непрерывно подавался детергент – ДСН (додецилсульфат натрия, фирмы SERVA) со

скоростью, которая обеспечивала поддержание в течение длительного времени (15-17 ч) концентрации ДСН в аквариуме с животными в одном случае (высокая концентрация детергента) около 1,9 мг/л ДСН, а во втором (низкая концентрация) – 0,3 мг/л ДСН, что составляет, соответственно, 19 и 3 ПДК для морской воды (Практическая экология морских регионов. Черное море, 1990). Действующие концентрации ДСН были выбраны нами в соответствии с данными Остроумова о пороговых концентрациях этого детергента, приводящих к ингибированию фильтрационной активности у мидий Черного моря (Остроумов, 2004), так чтобы «высокая» концентрация была несколько выше приведенной этим автором как пороговая (1,7 мг/л), а «низкая» - была бы в 6 раз ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная активность моллюсков претерпевает значительные изменения при кратковременном воздействии на организм измененной солености (используемой в качестве физиологической нагрузки). При таком гипоосмотическом стрессе, наблюдается быстрое закрытие створок (в течение 1-1,5 мин) и понижение средней ЧСС. Опосредованно по этим показателям мы можем судить о прекращении фильтрационной активности и снижении уровня потребления кислорода моллюсками, поскольку, как известно, ЧСС является надежным показателем респираторной функции организма.

В компенсаторном ответе кардиосистемы и поведенческой реакции мидий на тест-воздействие обращали внимание на временные характеристики развития реакции, а после снятия воздействия - на время возвращения ЧСС и характеристик движения створок мидий к первоначальному (до тестирования) паттерну, индивидуальному для особей. Эта методика использовалась нами как при отборе референтной группы, так и в экотоксикологических экспериментах для оценок воздействия детергента на функциональное состояние мидий. Отметим, что восстановление паттерна кривых ЧСС и ВРС мидий после снятия тест-воздействия происходило за 25-30 мин.

Реакция на загрязненность воды ДСН проявилась у моллюсков уже после первых 5-7 мин с начала поступления детергента в аквариум. В частности, уже через 15-18 мин все животные продемонстрировали защитный рефлекс изоляции – створки всех мидий закрылись и оставались в таком состоянии практически все время экспозиции. В состоянии закрытых створок мидии обычно переходят на анаэробный обмен, у них развивается гипоксия и связанное с ней снижение ЧСС до 10,5 уд/мин (брадикардия) в течение всего времени воздействия токсиканта.

Предполагалось, что воздействие детергента в течение 17 ч протока раствора с детергентом достаточно для того, чтобы привести к значительному ухудшению функционального состояния животных и к снижению их адаптивных возможностей реагировать на изменения характеристик среды их обитания (например, на гипоосмотический стресс). Однако тестирование адаптивных возможностей мидий после нагрузки в природной воде, а также после 17-часовой экспозиции в воде с содержанием 1,9 мг/л ДСН и «прошедших» после него 6-ти часовой отмыв чистой природной водой, показало, что время восстановления $T_{\text{восст.}}$ паттернов ЧСС и ВРС мидий практически совпало с их величинами до воздействия токсиканта (около 30 мин). О восстановлении функциональных характеристик моллюсков уже через 30 мин отмыва от детергента свидетельствует также способность всех испытуемых мидий мгновенно реагировать на изменение освещенности в помещении быстрым закрытием створок (shadow reflex).

Таким образом, адаптивная реакция моллюсков к действию загрязненной детергентом среды проявилась именно в защитном рефлексе изоляции (закрытие створок) при действии высоких концентраций токсиканта.

Последующий мониторинг ЧСС и ВРС выявил наличие суточного ритма активности животных, нарушенного экспериментально вызванным загрязнением воды, что убедительно свидетельствует о восстановлении функционального состояния животных. Способность к восстановлению функционирования после изменения качества среды обеспечивает моллюскам сохранение относительно стабильного уровня функциональной активности всего организма и является проявлением их адаптивных возможностей. По данным ряда исследователей закрытие створок двустворчатыми моллюсками при воздействии неблагоприятных условий даже на

продолжительное время не является для мидий стрессовой реакцией и не вызывает нарушений суточного ритма движений створок при снятии воздействия (Tran, 2003; Ham and Peterson, 1994).

При воздействии низкой концентрации детергента - 0,3 мг/л (3 ПДК), мидии не закрывали створок. Однако, уже через 2-3 часа такого воздействия, в движениях створок мидий начинали проявляться признаки стрессовой реакции. Это выражалось в появлении частых (от 2-3 до 6-8 в час) нерегулярных, судорожных закрываний-открываний створок (flapping activity), что обычно отмечается многими исследователями при умеренном ухудшении условий среды (Curtis et al., 2000). Пример такой активности в движении створок приведен на рис. 1 (см. например, в 22:43-22:50, 23.22-23:32 и далее). Анализ кривой ВРС показывает, что значительно изменяется характер «обратной» аддукции, а именно, возвращение к состоянию открытых створок - восходящая линия графика, имеет ступенчатый, затянутый по времени, характер. Такой вид активности продолжается еще длительное время (до 5-6-и часов) после снятия воздействия, т.е. в периоде отмыва от токсиканта. При таком характере поведенческих реакций мидий, на наш взгляд, могут нарушаться процессы фильтрации, дыхания и питания моллюсков. Длительное пребывание моллюсков в таких условиях может приводить к хроническому истощению их организма и, как следствие, к постепенной деградации популяции.

Тестирование функционального состояния мидий после воздействия низкой концентрации детергента, а также после 6-часового отмыва чистой морской водой, показало, что время восстановления $T_{\text{восст.}}$ паттернов ЧСС и ВРС мидий существенно возросло – до 45-60 мин.

Полученные данные указывают на то, что у моллюсков существует сложная организованная система восприятия опасного загрязнения и они используют различную стратегию адаптивных поведенческих и физиологических реакций в зависимости от силы и продолжительности токсического воздействия.

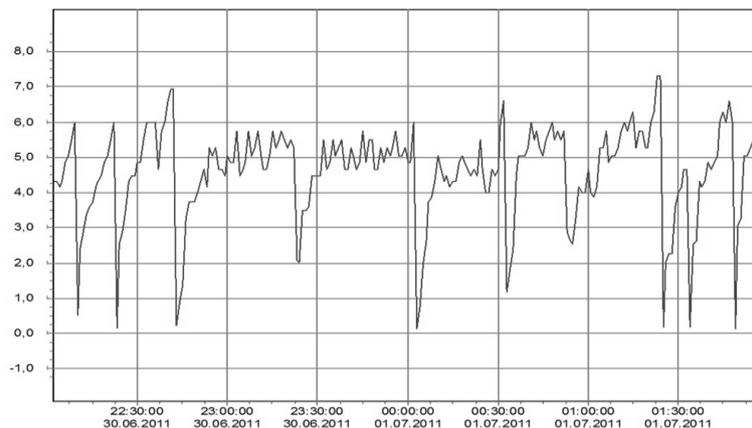


Рис. 1. Пример нерегулярных схлопываний раковины мидии № 9 с «затянутым» при открывании створок фронтом.

Таким образом, приведенные результаты указывают на существенные различия в ответных поведенческих и физиологических реакциях двустворчатых моллюсков при действии высоких и низких концентраций детергента. Это может свидетельствовать об опасности хронического действия на гидробионтов низких концентраций не только детергентов, но и других видов химических веществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Практическая экология морских регионов. Черное море. Альтман Э.Н., Безбородов А.А., Богатова Ю.И. и др. Под ред. В.П.Кеонджяна, Кудина А.М., Терехина Ю.В. – Киев: Наукова думка. 1990. С. 44.
2. Бергер В.Я. Адаптации морских моллюсков к изменениям солености окружающей среды. Л.: Наука, 216 с.
3. Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 1981. 135 с.
4. Остроумов С.А. О биотическом самоочищении водных экосистем. Элементы теории // ДАН, 2004. Т. 396. № 1. С. 136-141.

5. Трусевич В.В., Столбов А.А., Мишуров В.Ж., Шеянов В.А. Двигательная активность створок моллюсков как инструмент биологического мониторинга водной среды // Экология моря. 2006. вып.71. С. 64-67.
6. 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. P. 667-672.
7. Depledge, M.H., Andersen, B.B., 1990. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long-term recordings of cardiac activity in selected invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* V. 96A. P. 474-477.
8. 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 and valve movement of *Mytilus galloprovincialis* Lam.// SETAC Europe 18th Annual Meeting, 2008, Warsaw, 25-29 May 2008. Abstract Book (pdf). P. 168-169.
9. 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>.
10. 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 // *Journal of Environmental Bioindicators*. 2008. V. 3. №1. P. 23-34.
11. Kholodkevich S.V., T.V. Kuznetsova, K.K. Lehtonen, A.S. Kurakin. Experiences on ecological status assessment of the Gulf of Bothnia different sites based on cardiac activity biomarkers of caged mussels (*Mytilus edulis*) // ICES Annual Science Conference 2011, 19-23 September, Gdansk, Poland. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/CM-2011/R/R2011.pdf>, 12 p.
12. Ham K. D. and Peterson M. J. Effect of fluctuating low-level chlorine concentrations on valve-movement behaviour of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*)// *Environ. Toxicol. Chem.* 1994. V.13. P. 493-498.
13. Tran D., Ciret P., Ciutat A., Durrieu G., Massabuau J.-C. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to Cadmium// *Environ. Toxicol. Chem.* 2003. V. 22, P. 914-920.
14. Curtis T.M., Williamson R., Depledge M.H. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper // *Mar. Biol.* 2000. V. 136. P. 837-846.

**ADAPTIVE RESPONSES OF BLACK SEA MUSSELS
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LAM. TO ACTION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS
OF DETERGENT SDS (DODECYLSULFAT Na)**

T.V.Kuznetsova, V.V.Trusevich, M.P.Kirin, S.V.Kholodkevich

Detergents are known to be one of the main abiotic pollution factors in littoral zone of the Black Sea, which presence lead to negative effects on functioning of marine communities. In the present study behavioural (based on valve gape (VG) measurements) and cardiac responses (heart rate monitoring – HR) of *Mytilus galloprovincialis* Lam. under action of different doses of detergent (1,9 mg/l и 0,3 mg/l) – dodecylsulfat of natrium (SDS) were studied. Detergent was administrated to the tank with mussels through peristaltic pump in continuously running sea water flow. Changes in functional state of mussels under treatment were analyzed according to time of recovery $T_{\text{recov.}}$ (Kholodkevich et al., 2011) of background HR and VG patterns after removal of functional load – rapid variation in sea water salinity (hyposalinity test) up to 50% from ambient one. It was shown that high concentration of SDS caused rapid closure of the valves and sharp decline of HR lasted all time of exposure. However, depuration of mussels by plain sea water flow occurred in short period, testing procedure demonstrated that $T_{\text{recov.}}$ was equal to the values before toxic exposure (ca. 30 min).

Mussels exposed to 0,3mg/l (3 Permission Concentration) did not close their valves, but after 2-3h-exposure the features of stress response were observed in their behavior pattern. This was expressed in frequently occurred irregular acts of valves closure-opening (so called “flapping activity”). Testing of mussel’s functional status after low doses of SDS exposure and followed 6-h depuration revealed that $T_{\text{recov.}}$ was significantly increased – up to 45-60 min.

Obtained data indicated that mussels have complex well-organized system for detection of danger water quality and they use different behavioural and physiological adaptation strategies (according to strength and duration of chemical stress) as a responses to environmental impact.

АДАПТАЦИИ ГИДРОЛАЗ КОНСУМЕНТОВ, ЖЕРТВ И ЭНТЕРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ, РЕАЛИЗУЮЩИХ ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ, К УСЛОВИЯМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

В.В.Кузьмина

*Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742 Борок, Ярославская обл.
Россия. e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru*

Адаптации пищеварительных гидролаз, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника рыб, исследуются, начиная с конца XIX в. Наиболее подробно и разносторонне изучены адаптации ферментов, обеспечивающих последовательную деградацию сложных в биохимическом отношении компонентов пищи, позволяющие анализировать не только фенотипические, но и генотипические аспекты адаптаций. Известны видовые, индивидуальные, популяционные, биоценотические, а также температурные, нутритивные (адаптации к композиции пищи) и гомеостатические адаптации ферментных систем пищеварительного тракта рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Однако во второй половине XX в. были описаны неизвестные ранее механизмы пищеварения (Уголев, 1985), а в начале XXI в. пересмотрена классификация физиологических адаптаций процесса экзотрофии у рыб (Кузьмина, 2001). Было предложено рассматривать адаптации элементарных функций, реализуемых эргомами, или функциональными блоками (отдельными молекулами или их ассоциациями), локальные (подсистемные), системные, организменные (надсистемные) и надорганизменные адаптации. Последние включают, как взаимодействие с симбионтами, так и с потенциальными жертвами. Пересмотр классификации физиологических адаптаций вызвал необходимость изменения самого понятия адаптации (Кузьмина, 2001, 2005): **адаптация – спонтанно возникающая в процессе эволюции и закрепляющаяся путем естественного отбора совокупность реакций, охватывающая все уровни организации живых систем, которая способствует их эффективному функционированию и поддержанию устойчивости макросистем в условиях динамичной среды (внутренней и внешней).**

До последнего времени основное внимание уделялось изучению адаптаций элементарных функций, в частности исследованию нутритивных и температурных адаптаций ферментов, синтезируемых пищеварительной системой рыб. Наиболее подробно исследованы нутритивные адаптации, связанные с изменением активности ферментов в ответ на изменение концентрации соответствующих пищевых субстратов (Barrington, 1957; Уголев, Кузьмина, 1993). Твердо установлена большая активность протеиназ у зоофагов, особенно у типичных ихтиофагов, гликозидаз – у фитофагов, а также значительная пластичность ферментных систем у видов с широким спектром питания, которая проявляется на всех этапах онтогенеза (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, Гельман, 1998). Сопоставление активности одноименных гидролаз у видов, близких по типу питания, позволило выявить более тонкие адаптации к биохимическому составу пищи, чем предполагалось ранее. Так, на примере ряда видов рыб сем. Cyprinidae, близких по характеру питания (бентофаги), продемонстрированы адаптации ряда гликозидаз (α -амилаза, сахараза, ферменты группы мальтаз) к биохимическому составу объектов питания. Адаптации протеиназ слизистой оболочки кишечника к характеру питания у тех же видов рыб выражены слабее, щелочной фосфатазы – отсутствуют (Уголев, Кузьмина, 1993). Филогенетическая диссоциация ферментов выявляется на самых ранних этапах онтогенеза – в период перехода рыб на внешнее питание (Кузьмина, Гельман, 1998). На примере личинок карпа продемонстрирована этапность в функционировании отдельных ферментов цепи протеаз. Так, на этапе В, деградация белковых субстратов осуществляется преимущественно мембранными пептидазами, на этапе С₁ выявляется активность трипсина, на этапе D₁ – химотрипсина. На первом мальковом этапе (этап Е) наблюдается скачкообразное увеличение активности всех исследованных гидролаз, коррелирующее с изменением спектра питания и увеличением размеров кормовых объектов (Ильина, 1986, см. Кузьмина, Гельман, 1998). При изменении спектра питания в процессе онтогенеза рыб, как правило, в большей степени изменяется активность гидролаз, находящихся в начале ферментативной цепи (Уголев, Кузьмина, 1993).

Основным механизмом реализации нутритивных адаптаций гидролаз, по всей вероятности, является изменение количества синтезируемых ферментов в границах

эволюционно закрепленной адаптивной нормы реакции. Кроме того, адаптивные перестройки могут осуществляться благодаря существованию множественных молекулярных форм ферментов, а также возможности быстрых конформационных переходов от одной формы молекулы к другой в результате воздействия модификаторов как алиментарной, так и неалиментарной природы (см. Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003).

При изучении характеристик одноименных гидролаз у рыб, обитающих при различной температуре, а также при их акклимации к разной температуре выявлено многообразие механизмов, вовлекаемых в адаптивные перестройки пищеварительных ферментов. Продемонстрированы как генетически закрепленные свойства молекул, так и возможность быстрого изменения их характеристик. В ряде случаев обнаружены изменения, связанные с особенностями экологии и филогенеза видов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). Наибольшими адаптивными изменениями термостабильности, t° -функции и энергии активации ($E_{\text{акт}}$) характеризуются ферменты, находящиеся в начале цепи гликозидаз (α -амилаза) и протеаз (пепсин), обеспечивающие начальные этапы деградации полисахаридов и белков. Так, температурный оптимум α -амилазы у рыб, питающихся при температуре, близкой к 0°C , ниже, чем у рыб, не способных питаться в этих условиях (30 и 40°C), а относительная активность в диапазоне 0 - 20°C , напротив, выше (50 - 80% и 10 - 20% от максимальной активности, соответственно). Столь же значительно различается t° -функция пепсина и трипсина. У ихтиофагов относительная активность пепсина в зоне низких температур у рыб разных видов составляет 60 - 80% от максимальной активности. Относительная активность трипсина, обеспечивающего начальные этапы гидролиза белка у безжелудочных «мирных» рыб, независимо от типа питания рыб соответствует 5 - 15% от максимальной активности. Наиболее низкие величины $E_{\text{акт}}$ также выявлены при исследовании α -амилазы и пепсина у рыб, способных питаться при температуре, близкой к 0°C – 2.6 - 4.7 и 1.2 - 1.5 ккал/моль соответственно (Уголев, Кузьмина, 1993).

Характеристики ферментов, реализующих промежуточные и заключительные этапы гидролиза пищевых субстратов, относительно однородны. Однако в ряде случаев наблюдаются отличия, обусловленные особенностями филогенеза вида и адаптациями к условиям функционирования в далеком прошлом. Так, у арктического по происхождению налима, температурный оптимум глюкоамилазы и мальтазы соответствует 50°C , у обитающих в тех же водоемах представителей бореально-равнинного и понто-каспийского фаунистических комплексов – 60°C (Кузьмина, 1985; см. Уголев, Кузьмина, 1993). Наиболее убедительные доказательства адаптивного изменения t° -функции собственно кишечных гидролаз были получены при изучении характеристик щелочной фосфатазы у ряда видов рыб, обитающих в разных температурных зонах Атлантического океана (Gelman et al., 1993; см. Кузьмина, 2005). Так, температурный оптимум щелочной фосфатазы у глубоководной большой черной акулы *Etmopterus princeps*, обитающей при низкой температуре, равен 30°C , у большеглаза *Epigonus telescopus*, обитающего при высокой температуре – 60°C . Однако при исследовании глубоководной угольной сабли *Aphanopus carbo* обитающей, как и акула, при низкой температуре, выявлены парадоксально высокие значения температурного оптимума – 60°C . Показано, что этот феномен обусловлен особенностями филогенеза угольной сабли, 30 млн. лет тому назад обитавшей в условиях тропического шельфа и лишь позднее оттесненной конкурентами вглубь океана. Однако за истекший период t° -функция фермента, в значительной мере обусловленная термостабильностью белковых глобул, не изменилась. Однако величина $E_{\text{акт}}$ щелочной фосфатазы, как и у других видов холодолюбивых рыб, в зоне 0 - 10°C значительно ниже, чем в зоне более высоких температур, что способствует увеличению эффективности гидролитического процесса.

В настоящее время принято считать, что температурные, в том числе холодовые, адаптации ферментов реализуются за счет различных механизмов – генетически детерминированных и фенотипических. В первом случае изменения касаются первичной структуры молекул, в последнем адаптивность изменения характеристик ферментов может быть связана с прямым влиянием температуры на третичную структуру молекул фермента (Ночашка, Somero, 1973). Помимо этого изменение характеристик ферментов возможно благодаря существованию их множественных молекулярных форм. Так, из слизистой оболочки

кишечника ската *Raja radiata* выделены 2 изофермента щелочной фосфатазы, из слизистой оболочки пилорических придатков трески *Gadus morhua morhua* – 2 изозима химотрипсина. В гепатопанкреае карпа, а также в гепатопанкреае и кишечнике белого толстолобика выявлено 2 и 3 изоформы трипсина, 6 – химотрипсина и 2 – амилазы. У последнего вида, кроме того, обнаружено 3 изоформы лейцинаминопептидазы (см. Уголев, Кузьмина, 1993).

Адаптации гидролаз, функционирующих в составе мембран энтероцитов, помимо этого достигаются при участии гидрофобных доменов ферментов и липидного матрикса мембран. Солюбилизация ферментов при помощи детергентов и протеаз, а также делипидизация мембран существенно влияет на температурные характеристики различных гидролаз. Особо следует отметить адаптивные изменения жирнокислотного (ЖК) состава состава липидов слизистой кишечника рыб. Показано, что независимо от типа питания рыб летом увеличивается количество насыщенных ЖК и ЖК ω 6 типа, зимой – ненасыщенных ЖК, особенно полиеновых ЖК и ЖК ω 3 типа, а также низкомолекулярных жирных кислот, имеющих низкую температуру плавления, что позволяет мембранным ферментам ихтиофагов эффективно функционировать при низких температурах. Экстракция липидов приводит к сужению зоны оптимальных значений температуры (см. Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005).

В последние годы значительное внимание уделяется изучению надорганизменных адаптаций, включающего сопоставление характеристик одноименных гидролаз слизистой оболочки кишечника рыб с таковыми симбионтов и потенциальных жертв. Наиболее подробно изучена рН-функция и температурная зависимость протеиназ микробиоты тех и других. В ряде работ показано, что микроорганизмы, особенно представители р.р. *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Vibrio* синтезируют ферменты, аналогичные гидролазам пищеварительной системы рыб, способные гидролизовать различные пищевые субстраты, в том числе белковые компоненты пищи (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Однако характеристики протеиназ микробиоты рыб до начала наших работ были практически не исследованы. Вместе с тем наличие микроорганизмов, синтезирующих нейтральные протеиназы, дало возможность предположить, что ферменты микробиоты способны компенсировать относительно низкую активность протеиназ, синтезируемых рыбами, при значениях рН, лежащих ниже оптимума ферментов рыб, находящегося в зоне рН 10-11 (Уголев, Кузьмина, 1993). Позднее при исследовании ряда видов рыб была доказана справедливость этого предположения (Kuz'mina et al., 2011). Сопоставление рН-функции гликозидаз и протеиназ слизистой оболочки, химуса и микробиоты у рыб разных видов показало, что наибольшей изменчивостью отличаются характеристики последних. Так, максимальная активность протеиназ, функционирующих в составе слизистой, у всех видов рыб выявлена при рН 10. Однако оптимум рН ферментов энтеральной микробиоты у тех же видов рыб значительно варьирует: у плотвы находится при 5.0, у окуня – при 6.0, у судака и щуки – при 7.0, у леща – при 8.0, у налима – при 9.0. Отмеченные различия рН-функции протеиназ энтеральной микробиоты могут быть обусловлены разным соотношением нейтральных, щелочных и кислых протеиназ у разных видов микроорганизмов, а также разным составом микроорганизмов в полости кишечника и в среде обитания. При этом для бентофагов характерно большее разнообразие и большая численность энтеральной микробиоты по сравнению с таковыми у ихтиофагов (см. Уголев, Кузьмина, 1993).

Сопоставление результатов изучения влияния температуры на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса, а также энтеральной микробиоты у ряда видов рыб по казеину (преимущественно активность трипсина) и по гемоглобину (преимущественно активность химотрипсина) показало, что уровень активности протеиназ химуса значительно выше по сравнению с таковой слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты. Это связано с тем, что химус наряду с гидролазами, синтезируемыми поджелудочной железой и энтероцитами, содержит ферменты, синтезируемые микробиотой, и экзоферменты жертвы. При этом температурный оптимум трипсино- и химотрипсиноподобных протеиназ, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника у исследованных видов рыб, соответствует 50 или 60°C, а относительная активность в зоне низких температур (0-10°C) низка и обычно не превышает 20% от максимальной активности. Температурные характеристики энтеральной микробиоты у большинства исследованных видов достаточно близки таковым протеиназ слизистой оболочки кишечника. Однако в ряде случаев (окунь

налим, карась) относительная активность протеиназ в зоне низких температур у первых выше (30-45% от максимальной активности), чем у последних. Следовательно, протеиназы энтеральной микробиоты в большей степени, чем ферменты слизистой оболочки кишечника рыб, адаптированы к реализации процессов эндо- и экзотрофии. Также показано, что в зимний период относительная активность протеиназ микроорганизмов, ассоциированных со структурами тегумента цестод, обитающих в кишечнике рыб-ихтиофагов, в зоне низких температур значительно выше (40-55%) таковой одноименных гидролаз рыб – менее 10%, причем наибольшая относительная активность выявлена при более высоких значениях pH (Кузьмина, Первушина, 2004). Данные, полученные при исследовании температурных характеристик протеиназ микробиоты, ассоциированной с тегументом щуки и налима, а также энтеральной микробиоты карпа, свидетельствуют о том, щелочные протеиназы в большей степени адаптированы к функционированию при низких температурах по сравнению с нейтральными протеиназами. Этот факт подтвердил высказанное ранее предположение о том, что ферменты энтеральной микробиоты могут компенсировать недостаточно высокий уровень активности пищеварительных гидролаз рыб при низкой температуре (Уголев, Кузьмина, 1993).

Исследование активности протеиназ всех тканей потенциальных объектов питания рыб-ихтиофагов и сопоставление их с таковыми пищеварительного тракта у различных видов рыб также подтвердило их компенсаторную роль в процессах пищеварения консументов. Важно отметить, что активность протеиназ тканей объектов питания рыб, рассчитанная стандартным способом (на 1 г ткани), при 20°C исключительно низка (0.25- 0.70 мкмоль/г·мин по казеину (pH 5.0) и 0.5-2.0 мкмоль/г·мин по гемоглобину, pH 3.0). Тотальная активность протеиназ в тканях одной особи в первом случае колеблется от 1.20 до 2.30 мкмоль/мин, во втором – от 1.30 до 9.30 мкмоль/мин. Наибольший вклад ферментов жертвы (плотва, окунь) в процессы пищеварения консумента (щука, судак, окунь) характерен для рыб, обладающих желудком с ярко выраженной кислотообразующей функцией. При этом тотальная активность протеиназ жертвы (в основном катепсин D) может в 5-10 раз превышать тотальную активность протеиназ желудка консумента. Значительный вклад ферментов жертвы в гидролиз нутриентов, реализуемый в кишечнике, не выявлен. Однако обнаружено, что химотрипсиноподобные протеиназы способны выполнять компенсаторную роль при низкой температуре. Так, относительная активность трипсиноподобных протеиназ у рыб разных видов при 0°C составляет 2.6-8.3%, химотрипсиноподобных – 16.4-37.3% от максимальной активности. При исследовании $E_{акт}$ протеиназ, функционирующих в составе тканей у ряда видов рыб, показано, что величины $E_{акт}$ гемоглоблинитических протеиназ тканей жертвы, как правило, ниже таковых казеинлитических протеиназ, особенно у окуня и рыб сем. карповых. Поскольку низкие значения $E_{акт}$ свидетельствуют о большей эффективности процесса, полученные данные указывают на большую адаптированность гемоглоблинитических протеиназ тканей этих рыб к функционированию при низких температурах. Наиболее высокие величины $E_{акт}$ гидролиза гемоглобина в зоне 0-10°C отмечены для стерляди - единственного вида, у которого в зоне 10-30°C значения $E_{акт}$ в 2 раза ниже, чем в зоне 0-10°C (у остальных видов – в 1.3-3.2 раза выше). Выявленные различия свидетельствуют о зависимости температурных характеристик протеиназ тканей потенциальных объектов питания рыб от филогенетических особенностей вида.

Таким образом, адаптации процессов пищеварения у рыб разных экологических групп в значительной мере осуществляется за счет адаптивных перестроек функциональных блоков, в частности ферментов, функционирующих в пищеварительном тракте. Надорганизменные адаптации процессов пищеварения также в значительной мере базируются на адаптивных перестройках функциональных блоков симбионтов и жертв. Значительную роль в реализации нутритивных и температурных адаптаций у рыб разных экологических групп играют возникшие в процессе филогенеза видов изменения характеристик гидролаз консументов, потенциальных жертв и энтеральной микробиоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кузьмина В.В. Физиологические адаптации (на примере процесса экзотрофии у рыб) // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2001. Т. 37. № 3. С. 215-224.
2. Кузьмина В.В. Физиолого - биохимические основы экзотрофии рыб. М. 2005. 300 с.

3. Кузьмина В.В., Гельман А.Г. Особенности становления пищеварительной функции рыб // *Вопр. ихтиологии*. 1998. Т. 38. № 1. С. 113-122.
4. Кузьмина В.В., Первушина К.А. Влияние температуры и pH на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты рыб // *Журн. эволюц. биохим. физиол.* 2004. Т. 40. № 3. С. 214-219.
5. Лубянскене В., Вербицкас Ю., Янкявичус К., Лясаускене Л., Грибаускене В., Тряпшене О., Юзоленене Ю., Ястюгинене Р., Бабянскас М., Янкаускене Р. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма // *Вильнюс*. 1989. 191 с.
6. Неваленый А.Н., Туктаров А.В., Бедняков Д.А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. Астрахань: Информационно-издательский центр ФГОУ ВПО "АГТУ". 2003. 151с.
7. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 1985. 544 с.
8. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб. 1993. 238 с.
9. Шивокене Я.С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Моклас. 1989. 223 с.
10. Barrington E.J.W. The alimentary canal and digestion // *The physiology of Fishes*. New York - London: Acad. Press. 1957. V. 1. P. 109-161.
11. Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation // W.B. Saunders Company Philadelphia, London -Toronto. 1973. 418 p.
12. Kuz'mina V. V., Skvortsova E.G., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish // *Fish Physiol. Biochem.* 2011. V. 37. P. 345-353.

THE ADAPTATION OF HYDROLASES IN CONSUMERS, PREYS, AND ENTERAL MICROBIOTA REALIZING DIGESTIVE PROCESS IN FISH TO CONDITIONS OF THE FUNCTIONING

V.V.Kuz'mina

The adaptation of digestive processes in fish of different ecological groups, which are largely carried out by adaptive rearrangements of enzymes consumers, preys, and the enteric microbiota is described.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СУТОЧНЫХ ВЕРТИКАЛЬНЫХ МИГРАЦИЙ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* (L.)

В. В. Кузьмина, Ю.И.Соломатин

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН пос.Борок, Ярославская обл.

E-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

В ряде работ показано, что в период нагула лещ ночью из придонных горизонтов водохранилища поднимается в верхние слои воды (Денисов, 1978; Малинин, Базаров, 1983; Малинин, и др. 1996). Механизм этого явления окончательно не выяснен. Поскольку подъем рыб в толщу воды происходит после кормления, предполагалось, что это явление связано с питанием (Денисов, 1978). Не исключено, что одной из причин этого может быть более высокая температура в верхних слоях воды, способствующая увеличению темпов пищеварения. Изучению влияния температуры на активность пищеварительных гидролаз на протяжении последнего столетия уделялось большое внимание. Наиболее подробно исследована температурная зависимость, в частности величина температурного оптимума, относительная активность ферментов в зоне низких и постмаксимальных температур, а также значения кажущейся энергии активации ферментов (Уголев, Кузьмина, 1993). Вместе с тем для оценки влияния температуры на темпы деградации пищи в ходе суточных вертикальных миграций наибольший интерес представляет температурно-зависимое изменение активности ферментов в диапазоне жизнедеятельности рыб. В этом отношении заслуживает внимания лещ, питающийся в диапазоне температур от 7 до 28 °С и совершающий в нагульный период суточные вертикальные миграции. Так, летом (в июле) взрослый лещ в дневное время в Рыбинском водохранилище держится преимущественно в придонных горизонтах при температуре воды

9–10°C. Ночью значительная часть рыб поднимается в верхние слои воды, где температура может достигать 20 °С. В сентябре на русловых участках лещ поднимается в верхние слои воды и в дневное время (Малинин, Базаров, 1983; Малинин и др. 1996). Изменение температурного режима водоема и его температурная стратификация не могут не отражаться на активности пищеварительных гидролаз. Важно отметить, что быстрые перемещения рыб в градиенте температур, как правило, не сопряжены с изменением интенсивности синтеза ферментов. Возможны лишь модификационные изменения ферментативной активности (Ночачка, Somero, 1973; Уголев, Кузьмина, 1993). Однако ранее температурно-зависимое изменение активности ферментов, гидролизующих различные компоненты пищи в диапазоне температур, соответствующем температуре активного питания рыб в связи с суточными вертикальными миграциями рыб не анализировалось.

Цель работы состояла в изучении влияния температуры на активность ряда гликозидаз, протеиназ и фосфатаз, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника, для оценки возможной роли процессов пищеварения в суточных вертикальных миграциях леща.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследован лещ *Abramis brama* (L.) разных размерно-возрастных групп из траловых уловов, массой от 202 до 1534 г. Материал собран летом (июнь-июль) на Рыбинском водохранилище вблизи п. Борок. В июне рыб, размером 25±2 см, после поимки в течение 1 ч доставляли в лабораторию. Для определения активности пищеварительных ферментов у рыб на холоду изымали кишечник и помещали его на ледяную баню. Вырезали медиальный отдел кишечника. Затем специальным скребком отделяли химус, стенку кишечника промывали охлажденным при температуре, не превышающей 4°C, раствором Рингера для холоднокровных животных (109 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.1 mM CaCl₂, 1.2 mM NaHCO₃), осторожно осушали фильтровальной бумагой и снимали слизистую оболочку. В опытах по изучению влияния температуры на активность ферментов готовили суммарные пробы, в состав которых входила слизистая от 5-7 экз. рыб. Слизистую тщательно перемешивали и отбирали аликвоту для приготовления исходного гомогената. Гомогенаты готовили при помощи стеклянного гомогенизатора, добавляя охлажденный до 2-4°C раствор Рингера в соотношении 1:9. Затем гомогенаты разводили в 2 раза для определения активности гликозидаз (за исключением сахаразы), в 4 раза для определения активности фосфатаз и в 10 раз для определения активности протеиназ. Определения проводили при pH 7.4 или 8.5 (для протеиназ). Инкубацию проводили при температуре 0, 10, 20 и 30°C в течение 10 или 30 мин при непрерывном перемешивании. В начале июля изъятие кишечника и все последующие процедуры производились на экспедиционном судне сразу после проведения биоанализа. Кишечники замораживали. Активность ферментов в химусе и слизистой оболочке определяли в лаборатории. Общую протеолитическую активность - преимущественно трипсин, КФ 3.4.21.4 (ОПА) определяли по приросту тирозина методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации. Субстрат - 1% раствор казеина. Общую амилолитическую активность - суммарная активность α-амилазы, КФ 3.2.1.1, γ-амилазы, КФ 3.2.1.3 и ферментов группы мальтаз, КФ 3.2.1.20 (ОАА), активность сахаразы (КФ 3.2.1.48) и активность γ-амилазы (КФ 3.2.1.3) оценивали по приросту гексоз с помощью метода Нельсона в модификации Уголева и Иезуитовой (Уголев, 1969), мальтазы – глюкозооксидазным методом Городецкого (Уголев, 1969). Субстраты – 50 mM растворы сахарозы и мальтозы, а также 1% раствор растворимого крахмала. Активность α-амилазы определяли по методу Смита и Роя в модификации Уголева (1969). Субстрат - 0.1% раствор растворимого крахмала. Активность щелочной и кислой фосфатаз оценивали по приросту *p*-нитрофенола. Субстраты – 0.6 и 1.8 mM раствор *p*-нитрофенилфосфата натрия соответственно. Все субстраты готовили на растворе Рингера. В случае индивидуальных проб ферментативную активность определяли в 2-х повторностях, в случае суммарных проб - в 5-ти повторностях для каждой точки с учетом фона. Активность выражали в мкмоль/(г·мин) или мг/(г·мин). Данные обработаны статистически. Достоверность различий оценивали при помощи критерия Стьюдента для малых выборок при уровне значимости $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние температуры на активность пищеварительных ферментов. Данные, касающиеся влияния температуры на активность некоторых пищеварительных ферментов у леща, приведены в табл. 1.

Поскольку летом в Рыбинском водохранилище температура воды в придонных слоях русловых участков (месте нагула рыб старших возрастных групп) близка к 10°C, величина ферментативной активности при этой температуре была принята за 100%.

Таблица 1. Влияние температуры на активность ферментов слизистой оболочки кишечника леща, мкмоль/(г·мин)

| Температура, °С | Ферментативная активность | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | ОПА | ОАА | α -амилаза ¹ | γ -амилаза | мальтаза | сахараза | щелочная фосфатаза | кислая фосфатаза |
| 0 | 0.74±0.09 (61) | 1.67±0.06 (37) | 2.14±1.14 (61) | 0.57±0.13 (61) | 0.19±0.09 (43) | 0.22±0.03 (73) | 0.33±0.01 (45) | 0.58±0.04 (41) |
| 10 | 1.21±0.18 (100) | 4.48±0.15 (100) | 3.53±1.88 (100) | 0.94±0.13 (100) | 0.44±0.10 (100) | 0.30±0.04 (100) | 1.00±0.02 (100) | 1.40±0.04 (100) |
| 20 | 2.18±0.14 (180)* | 7.69±0.22 (172)* | 7.07±3.71 (199)* | 0.68±0.17 (179) | 0.55±0.10 (125) | 0.36±0.03 (120) | 1.66±0.02 (166)* | 2.75±0.02 (196)* |
| 30 | 3.29±0.23 (272)* | 15.94±0.35 (356)* | 9.72±4.80 (275)* | 2.37±0.22 (252) | 0.66±0.12 (150) | 0.47±0.03 (157) | 3.11±0.03 (311)* | 3.89±0.04 (278)* |

Примечание: В скобках указано изменение ферментативной активности по сравнению с таковой при 10°C, принятой за 100%. ¹ - мг/ (г·мин). * - достоверное увеличение по сравнению с показателями, полученными при 10°C.

При увеличении температуры на 10°C активность большинства ферментов увеличивается в 1.6-2 раза. Известно, что скорость процесса гидролиза белков и полисахаридов лимитируется ферментами, находящимися в начале цепи протеаз и гликозидаз, а ОПА и ОАА в значительной мере отражают активность трипсина, химотрипсина и амилаз соответственно (Уголев, Кузьмина, 1993). Данные, касающиеся гликозидаз, свидетельствуют о значительно большей зависимости ферментов, обеспечивающих начальные этапы гидролиза биополимеров (α -амилаза) от температуры по сравнению с ферментами, реализующими заключительные стадии этого процесса (мальтаза). Преимущества в скорости гидролиза пищевых субстратов, получаемые при более высокой температуре, подтверждаются экспериментальными данными, касающимися поведения леща в термоградиенте. Показано, что по мере голодания двухлетки леща избирают зону с более низкой температурой, а после начала питания голодающие рыбы в термоградиенте меняют предпочитаемую температуру с 14.8°C на 26.9°C (Базаров, Голованов, 2000). Эти данные подтверждают, что для успешного пищеварения желательна перемещение рыб в среду с более высокой температурой воды, наблюдающейся в ее поверхностных слоях. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции может быть обусловлено действием ряда различных факторов. Температура влияет на стабильность ферментов, скорость распада фермент-субстратного комплекса, сродство фермента к субстрату, рН-функцию одного или всех компонентов реакции, сродство ферментов к активаторам или ингибиторам, а также на природу ключевой реакции, если в системе участвует несколько ферментов с различными температурными коэффициентами (Диксон, Уэбб, 1982).

Уровень общей протеолитической и общей амилалитической активности в химусе и слизистой оболочке кишечника леща разных размерно-возрастных групп. Поскольку в верхние слои воды преимущественно поднимаются особи младших возрастных групп (Денисов, 1978; Малинин, Базаров, 1983; Малинин и др. 1996), было необходимо выяснить влияние возраста на процессы пищеварения у рыб разных размерно-возрастных групп. Для

этого исследовали активность ферментов, обеспечивающих гидролиз белковых и углеводных компонентов пищи у леща разных размерно-возрастных групп (табл. 2).

Как показывает таблица, уровень ОПА и ОАА в химусе и слизистой оболочке кишечника леща трех размерно-возрастных групп при одной и той же температуре (20°C) достоверно не различается.

Таблица 2. Общая протеолитическая и общая амилолитическая активность кишечника леща разных размерно-возрастных групп при 20°C, мкмоль/ (г·мин), n = 10

| Длина тела, см | Масса, г | Общая протеолитическая активность | | | Общая амилолитическая активность | | |
|----------------|--------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------------------------------|-----------|----------|
| | | Химус | Слизистая | Сумма | Химус | Слизистая | Сумма |
| < 25 | 234.5±10.8 | 9.5±0.5 | 6.6±0.7 | 16.1±1.1 | 13.1±2.7 | 11.4±1.6 | 24.5±3.2 |
| 25–35 | 455.5±14.8 | 9.1±0.69 | 6.6±0.8 | 15.7±0.8 | 13.9±2.4 | 8.10±1.6 | 22.0±2.5 |
| >35 | 1446.5±149.6 | 10.0±0.5 | 5.5±1.1 | 4.6±1.6 | 4.1±1.0 | 7.6±0.5 | 21.7±1.5 |

Однако у рыб старших возрастных групп ОПА и ОАА в химусе, а также активность ферментов в слизистой оболочке, особенно гликозидаз, несколько ниже, чем у рыб двух других групп. Поскольку температурные характеристики одноименных ферментов у рыб одного и того же вида исключительно близки (Уголев, Кузьмина, 1993), данные, представленные в табл. 1 и 2, позволяют рассчитать уровень ОПА и ОАА в придонных слоях Рыбинского водохранилища. Расчеты показали, что при 10°C суммарная протеолитическая активность химуса и слизистой оболочки кишечника у рыб трех возрастных групп соответствует 9.5, 9.2 и 8.6 мкмоль/ (г·мин), амилолитическая – 13.6, 12.2 и 12.1 мкмоль/ (г·мин). Приверженность леща, особенно рыб старших возрастных групп, к придонным слоям воды в светлое время суток может быть связана с тем, что основу их питания составляет хирономидно-олигохетный комплекс кормовых объектов. При этом встречаемость леща в толще воды в вечерние и ночные часы, вероятно, объясняется как преимуществами в деградации пищевых субстратов при более высокой температуре, так и тем, что в толще воды лещ, особенно его младшие возрастные группы, в значительной мере питается планктонными организмами (Житенева, 1958). Важно отметить, что в организме олигохет и хирономид в большем количестве представлены полипептиды с большей молекулярной массой, чем у представителей зоопланктона, в организме которых доминируют аминокислоты и низкомолекулярные пептиды. Так, у представителей зоопланктона 90% растворимых белковых компонентов приходится на фракцию с молекулярной массой 1 кДа. У олигохет на эту фракцию приходится 52%, а на фракцию 500 кДа – 36%. У хирономид 74% растворимого белка имеет молекулярную массу 10-20 кДа (Кузьмина и др., 1990). Следовательно, перемещение леща в толщу воды дает преимущество не только благодаря увеличению скорости гидролиза биополимеров, но и благодаря уменьшению количества компонентов пищи, требующих вовлечения в гидролиз панкреатических ферментов, обеспечивающих начальные этапы пищеварения. Особенно это касается аминокислот, не требующих деградации. Несмотря на то, что суточные вертикальные миграции не всегда могут быть объяснены влиянием температуры на активность пищеварительных ферментов, ясно, что процессы пищеварения при этом играют немаловажную роль.

Анализируя физиологические аспекты суточных вертикальных миграций леща, также необходимо отметить, что перемещение в верхние слои воды компенсирует уменьшение освещенности в придонных слоях воды (Денисов, 1978). При этом известно о зависимости интенсивности синтеза гормона роста, которому в настоящее время придается большое значение в регуляции потребления пищи и ее усвоении, от длины светового периода (Perez et al., 1995; Vjoernsson, 1997; Farmanfarmaian, Sun, 1999). Это дает возможность предположить, что суточные вертикальные миграции леща связаны не только с прямым увеличением активности пищеварительных ферментов и большим потреблением зоопланктона в верхних слоях воды, но и с влиянием светового фактора, индуцирующего синтез гормона роста, который в свою очередь влияет на гормональный статус рыб, интенсивность питания и процессы пищеварения.

Таким образом, степень увеличения активности пищеварительных гидролаз, обеспечивающих гидролиз белков, углеводов и эфиров ортофосфорной кислоты в кишечнике леща, при увеличении температуры в диапазоне жизнедеятельности рыб различна. Увеличение температуры в диапазоне 10-30°C, как правило, в большей степени влияет на активность всех исследованных пищеварительных гидролаз, чем в зоне 0-10°C, что способствует ускорению процессов пищеварения при повышении температуры окружающей среды. Это обстоятельство может быть одной из причин суточных вертикальных миграций леща. Высказано предположение о том, что помимо температуры и большего потребления зоопланктона в верхних слоях воды на интенсивность питания и процессы пищеварения, в том числе активность пищеварительных ферментов, влияет зависимое от степени освещенности изменение гормонального статуса рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Базаров М.И., Голованов В.К. Влияние голодания на термопреферендум молоди леща в длительном эксперименте. // Тез. докл. на IX Всероссийской конф. Экологическая физиология и биохимия рыб. 2000. Т. 1. С. 18-21.
2. Денисов Л.И. Рыболовство на водохранилищах. М.: Пищевая пром-ть, 1978. 282 с.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М. Наука, 1982. Т.1. С.235-259.
4. Житенева Т.С. О питании леща в Рыбинском водохранилище // Тр. Биол. ст. «Борок» 1958. Вып. 3. С. 259–273.
5. Кузьмина В.В., Латов В.К., Посконова Е.А. Молекулярно-массовые характеристики белковых компонентов некоторых кормовых объектов рыб // Биол. внутр. вод: Информ. бюл. 1990. № 88. С 73-77.
6. Малинин Л.К., Базаров М.И. О вертикальном распределении леща в период нагула // Тр. ИБВВ АН СССР. 1983. Вып. 48. С. 142–150.
7. Малинин Л.К., Базаров М.И., Голованов В.К., Линник В.Д. Влияние температуры воды на диапазон суточных вертикальных миграций рыб. / В кн. Поведение и распределение рыб, Доклады 2-го Всероссийского совещания «Поведение рыб» Борок, 1996. С.103–119.
8. Уголев А.М. (ред.). Обзор современных методов. Л. Наука, 1969. С. 187-192.
9. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб: Гидрометеиздат, 1993. 238 с.
10. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. 1938.V.22. P.79-83.
11. Bjoernsson B.Th. The biology of salmon growth hormone: From daylight to dominance // Fish Physiol. Biochem. 1997. V. 17. № 1-6. P. 9-24.
12. Farmanfarmaian A., Sun L.Z. Growth hormone effects on essential amino acid absorption, muscle amino acid profile, N-retention and nutritional requirements of striped bass hybrids // Gen. Anal. Biomol. Engineer. 1999. V. 15. № 3-5. P. 107-113.
13. Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation // Philadelphia- London-Toronto. W.B. Saunders Company. 1973. 418 p.
14. Perez S. J., Marti P. H., Kaushik S.J. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in marine teleosts, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // J. Nutr. 1995. V. 125. № 3. P. 546-552.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF DIURNAL VERTICAL MIGRATIONS OF BREAM *ABRAMIS BRAMA* (L.)

V.V. Kuz'mina, Yu.I. Solomatin

It is shown that an increase of the activity of a number of digestive hydrolases functioning in bream intestine with the increasing of temperature may be one of the reasons of fish vertical migration. In the addition to the influence of the temperature on the intensity of fish feeding and digestion in the upper layers of water can affect the changes in the hormonal status of the fish, which depends on the light.

ВЛИЯНИЕ ТИПА ПИТАНИЯ РЫБ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОТЕИНАЗ ЭНТЕРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

В.В.Кузьмина¹, М.В. Шалыгин², Г.В.Золотарева³, Е.Г.Скворцова², В.А.Шептицкий³

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, 152742 Борок, Ярославская обл.
Россия. e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru

² ФГОУ ВПО Ярославская государственная сельскохозяйственная академия, 150042 Ярославль,
Россия. e-mail: kafiza@mail.ru

³ Приднестровский Государственный Университет им. Т.Г. Шевченко, 3300 Тирасполь,
Молдова. e-mail: septitchi@mail.ru

Протеиназы играют ключевую роль в процессах пищеварения рыб. В последние десятилетия показано, что в полости кишечника рыб функционируют ферменты, синтезируемые не только поджелудочной железой, но и энтеральной микробиотой, а также экзоферменты, приносимые тканями жертвы (Уголев, Кузьмина, 1993). Бактериальная флора пищеварительного тракта животных, в том числе рыб, выполняющая целый ряд важных функций, в частности, участвует в процессах симбионтного пищеварения. Известно, что микроорганизмы синтезируют ферменты, аналогичные гидролазам пищеварительной системы рыб, которые способны гидролизовать различные пищевые субстраты, в том числе белковые компоненты пищи (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Buddington et al., 1997; Кузьмина, Скворцова, 2002; Кузьмина, 2005). В кишечнике пресноводных рыб, как правило, преобладают микроорганизмы, принадлежащие к р.р. *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Pseudobacterium*, *Azotobacter* и *Sarcina*. Иногда, обычно в загрязненных водоемах, встречаются бактерии р. *Vibrio* (Лубянскене и др., 1989). В кишечнике рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище, найдены микроорганизмы р.р. *Pseudomonas* и *Bacillus*, а также кокковые формы, коринебактерии и микромицеты (Кузьмина, Скворцова, 2002).

Протеолитической активностью обладают представители р.р. *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Vibrio* и другие (Шивокене, 1989; Кузьмина, Скворцова, 2002). Микроорганизмы, обитающие в кишечнике, как правило, синтезируют комплекс протеаз, проявляющих максимальную активность при нейтральных или щелочных значениях рН. Максимальную активность нейтральные протеиназы проявляют при рН 7.0. Щелочная протеиназа *Ps. aeruginosa* устойчива в интервале рН 5-9 (Лубянскене и др., 1989). На основании данных литературы было высказано предположение о том, что ферменты микробиоты могут компенсировать относительно низкую активность протеиназ, синтезируемых рыбами, при значениях рН, лежащих ниже оптимума ферментов рыб, находящегося в зоне рН 10-11 (Уголев, Кузьмина, 1993). Позднее при исследовании ряда видов рыб была доказана справедливость этого предположения (Kuz'mina et al., 2011). Кроме того, установлено, что в зимний период относительная активность протеиназ микроорганизмов, функционирующих на структурах тегумента цестод, обитающих в кишечнике рыб-ихтиофагов, в зоне низких температур значительно выше таковой одноименных гидролаз рыб. Этот факт позволил высказать предположение о том, что ферменты энтеральной микробиоты могут компенсировать недостаточно высокий уровень активности пищеварительных гидролаз рыб при низкой температуре (Кузьмина, Первушина, 2004).

Вместе с тем оставалось неясным, насколько типичны выявленные характеристики для всей энтеральной микробиоты, в частности возможна избирательность адгезии отдельных видов микроорганизмов на поверхности тегумента цестод, а также для микробиоты рыб, различающихся по характеру питания. При этом известно, что видовой состав автохтонной, или индигенной (прикрепленной) микробиоты относительно постоянен, в то время как состав транзитной (полостной) микрофлоры в значительной мере зависит от изменения такового в воде и пище (Buddington et al., 1997; Извекова и др., 2007). В связи с этим цель работы состояла в изучении температурной зависимости и рН-функции протеиназ энтеральной микробиоты и, для сравнения, слизистой оболочки кишечника у рыб, различающихся по характеру питания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проведена в течение 2007-2011 гг. Объекты исследования - половозрелые особи 8-ми видов рыб: планктофаг синец *Abramis ballerus* (L.), бентофаги карась *Carassius carassius*,

карап *Cyprinus carpio*, плотва *Rutilus rutilus* (L.), и лещ *Abramis brama* (L.), ихтиофакультативный бентофаг окунь *Perca fluviatilis* L., а также типичные ихтиофаги налим *Lota lota* (L.), щука *Esox lucius* L. и судак *Zander lucioperca* (L.), отловленные в Рыбинском водохранилище. Весь материал собран в период активного питания летом или зимой (налим). В качестве ферментативно активных препаратов использовали культуры микробиоты, выделенной из химуса, и слизистую оболочку кишечника. Методы подробно описаны ранее (Кузьмина, Первушина, 2004). Результаты обработаны статистически при помощи стандартного пакета программ (Microsoft Office XP приложение Excel) и приведены в виде средней \pm SE. Достоверность различий оценивали при помощи критерия Стьюдента для малых выборок при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Температурная зависимость протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника рыб. Исследование активности казеинлитических (трипсиноподобных) протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника в широком диапазоне температур у типичных и факультативных ихтиофагов позволило в ряде случаев выявить существенные различия, как в уровне ферментативной активности, так и в форме кривых температурной зависимости ферментов, синтезируемых микробиотой и пищеварительной системой рыб. Так, при pH 7.4 у щуки уровень активности протеиназ слизистой оболочки кишечника соответствует 4.0 ± 0.1 , у налима – 3.6 ± 0.2 , у судака – 1.7 ± 0.03 , у окуня – 0.9 ± 0.1 мкмоль/(г·мин). Активность протеиназ энтеральной микробиоты при той же температуре и pH у щуки составляет 0.8 ± 0.03 , у судака – 0.4 ± 0.1 , у окуня – 0.4 ± 0.1 , у налима – 4.2 ± 0.1 мкмоль/(г·мин). Температурный оптимум ферментов слизистой и энтеральной микробиоты у рыб сем. окуневых (окунь, судак) и налима находится при 50°C . У щуки температурный оптимум протеиназ слизистой соответствует 50°C , энтеральной микробиоты – 60°C . Относительная активность протеиназ слизистой оболочки при 0°C у судака и окуня близки (9 и 10 %), у налима – 15%, у щуки – 24% от максимальной активности, энтеральной микробиоты – 10, 38, 30 и 16 % соответственно. В зоне постмаксимальных температур (при 70°C) относительная активность протеиназ слизистой щуки составляет 83, судака – 67, окуня – 24%, энтеральной микробиоты – 59, 8 и 34%, соответственно.

Активность протеиназ слизистой оболочки кишечника у бентофагов карпа, плотвы и карася при 20°C соответствует 1.5 ± 0.2 , 3.2 ± 0.1 и 1.6 ± 0.1 мкмоль/(г·мин), энтеральной микробиоты – 3.2 ± 0.2 , 0.2 ± 0.1 и 1.1 ± 0.1 соответственно. Температурный оптимум ферментов слизистой и энтеральной микробиоты у первых двух видов находится при 50°C , у карася – в зоне 50 – 60°C соответственно. Относительная активность протеиназ слизистой оболочки при 0°C составляет 5% (у плотвы) и 15% (у карпа и карася) от максимальной активности, энтеральной микробиоты – 13, 5 и 45% соответственно. В зоне постмаксимальных температур (при 70°C) относительная активность протеиназ слизистой оболочки и энтеральной микробиоты плотвы значительно ниже, чем у карпа и карася – 5, 83 и 82%, а также 15, 87 и 65% соответственно. При увеличении значений pH не только возрастает активность протеиназ микробиоты, но и изменяются кривые температурной зависимости. На примере карпа показано, что при увеличении pH от 7.4 до 8.5 относительная активность протеиназ энтеральной микробиоты при 0°C увеличивается от 5 до 15%, а зона оптимальных значений расширяется от 50 – 60 до 40 – 60°C . Также показано, что величины кажущейся $E_{\text{акт}}$ протеиназ слизистой оболочки кишечника в большинстве случаев выше, чем таковые энтеральной микробиоты. Наиболее низкие значения $E_{\text{акт}}$ энтеральной микробиоты (менее 2.0 ккал/моль) выявлены при исследовании протеиназ у окуня и карася.

pH-функция протеиназ энтеральной микробиоты и слизистой оболочки кишечника рыб. Полученные результаты свидетельствуют о том, что протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у рыб разных видов при одних и тех же значениях pH различна (табл.1).

Таблица 1. Влияние pH на протеолитическую активность слизистой оболочки и энтеральной микробиоты у рыб разных экологических групп, мкмоль/(г·мин)

| Вид | Значения pH | | | | | |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | 5.0 | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 9.0 | 10.0 |
| Плотва | 0.04±0.02 (2.9) | 0.14±0.04 (10.0) | 0.27±0.05 (19.4) | 0.44±0.05 (31.7) | 1.00±0.18 (71.9) | 1.39±0.06 (100) |
| | 1.09±0.15 (100) | 0.59±0.20 (54.1) | 0.63±0.15 (57.8) | 0.30±0.07 (27.5) | 0.67±0.06 (61.5) | 0.97±0.15 (89.0) |
| Лещ | 0.08±0.03 (5.7) | 0.16±0.05 (11.4) | 0.31±0.05 (22.0) | 0.50±0.08 (35.5) | 1.05±0.11 (74.5) | 1.41±0.05 (100) |
| | 1.01±0.22 (71.6) | 0.59±0.18 (41.8) | 0.69±0.23 (48.9) | 1.41±0.25 (100) | 0.55±0.21 (39.0) | 0.83±0.25 (58.9) |
| Окунь | 0.35±0.04 (20.1) | 0.93±0.18 (53.4) | 1.19±0.22 (68.4) | 1.54±0.22 (88.5) | 1.68±0.16 (96.6) | 1.74±0.17 (100) |
| | 0.82±0.12 (65.6) | 1.25±0.26 (100) | 0.63±0.22 (50.4) | 0.55±0.19 (44.0) | 0.32±0.06 (25.6) | 0.48±0.13 (38.4) |
| Судак | 0.13±0.03 (13.7) | 0.20±0.04 (21.1) | 0.33±0.05 (34.7) | 0.60±0.13 (63.2) | 0.81±0.09 (85.3) | 0.95±0.08 (100) |
| | 0.46±0.15 (20.2) | 1.56±0.36 (68.4) | 2.28±0.27 (100) | 1.27±0.18 (55.7) | 0.65±0.16 (28.5) | 1.13±0.20 (49.6) |

Примечание. Верхние цифры - ферментативная активность слизистой оболочки кишечника, нижние – энтеральной микробиоты. Жирным шрифтом выделены величины оптимума pH. В скобках указана относительная активность, % от максимума, принятого за 100.

Важно отметить, что оптимум pH протеиназ слизистой у всех видов рыб находится при 10.0, микробиоты – варьирует: у плотвы – при 5.0, у окуня – при 6.0, у судака – при 7.0, у леща – при 8.0. Наблюдаемые различия характеристик ферментов приводят к существенным различиям в соотношении ферментативной активности слизистой и микробиоты при разных значениях pH. При этом варьирует не только величина оптимума pH, но и относительная активность ферментов в зонах, лежащих за пределами оптимума. Так, при pH 10.0 у микробиоты плотвы сохраняется 89% от максимальной активности при pH 5.0, у леща – 59% (pH 10.0) и 72% (pH 5.0) от максимальной активности при pH 8.0. Аналогичный феномен обнаружен и при исследовании pH-функции судака – при pH 10.0 сохраняется 50% от максимальной активности при pH 7.0. Еще более высокие значения относительной активности протеиназ в зонах, лежащих за пределами оптимума, обнаружены при исследовании химуса плотвы - при pH 10.0 сохраняется 94% от максимальной активности при pH 7.0. У леща ферментативная активность химуса близка в зоне pH 7.0-10.0, а у окуня и судака при pH 8.0 сохраняется 84 и 91% от максимальной активности при pH 10.0.

При обсуждении материала следует подчеркнуть, что данные, касающиеся температурных характеристик протеиназ слизистой оболочки кишечника у исследованных видов рыб, хорошо согласуются с результатами, полученными ранее (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина и др., 2008). Действительно, температурный оптимум трипсиноподобных протеиназ, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника у исследованных видов рыб, соответствует 50 или 60°C, а относительная активность в зоне низких температур (0-10°C) низка и лишь в редких случаях незначительно превышает 20% от максимальной активности. Температурные характеристики энтеральной микробиоты достаточно близки таковым протеиназ слизистой оболочки кишечника, однако в ряде случаев их относительная активность в зоне низких температур выше, чем у последних. Так, при 0°C относительная активность энтеральной микробиоты у налима соответствует 30, у окуня - 38, у карася – 45% от максимальной активности. Различия температурной зависимости протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты, по-видимому, обусловлены не только разным составом протеиназ, функционирующих на структурах слизистой оболочки кишечника, а также протеиназ, синтезируемых микробиотой, но и разными характеристиками тех и других. Данные, касающиеся налима, окуня и карася, свидетельствуют об адаптивном изменении

характеристик протеиназ энтеральной микробиоты у этих видов рыб. Последнее способствует более эффективному функционированию протеиназ энтеральной микробиоты по сравнению с таковыми слизистой оболочки при низких температурах, а, следовательно, их важной компенсаторной роли в процессах пищеварения рыб. Известно, что окунь может активно питаться в зимний период, в то время как карась переходит на эндогенное питание. Следовательно, протеиназы энтеральной микробиоты окуня и карася в большей степени, чем ферменты слизистой оболочки кишечника рыб, адаптированы к реализации процессов экзотрофии. Данные, полученные при исследовании температурных характеристик карпа, позволяют сделать важный вывод о том, что при изучении влияния температуры на активность ферментов рыб в стандартных условиях при рН 7.4 регистрируются в основном характеристики нейтральных протеиназ. При этом температурные характеристики щелочных протеиназ могут в большей степени быть адаптированными к функционированию при низких температурах по сравнению с нейтральными протеиназами.

Об этом же свидетельствуют данные, касающиеся влияния рН на активность трипсиноподобных протеиназ. Различия рН-функции протеиназ микробиоты у рыб разных видов, выявленные в данной работе, могут быть обусловлены разным соотношением ферментов (нейтральные, щелочные и кислые протеиназы) у разных видов микроорганизмов. При этом может различаться как состав микроорганизмов в среде обитания – судак и частично окунь обитают в пелагиали, лещ и плотва, и – в придонных слоях воды. При этом известно о большем разнообразии и большей численности энтеральной микробиоты у бентофагов (лещ) по сравнению с таковой у ихтиофагов - судак (Зубкова, см. Кузьмина, 2005). Также необходимо подчеркнуть, что в отличие от других видов рыб типичный ихтиофаг судак обладает желудком с ярко выраженной кислотообразующей функцией, позволяющей эффективно функционировать кислым протеиназам. Большая активность протеиназ микробиоты при низких значениях рН у бентофагов (у плотвы - 100, у леща – 71, у окуня - 66, у судака – 20% от максимальной активности), по-видимому, связана с тем, что пепсиноподобные протеиназы микробиоты могут выполнять важную компенсаторную функцию. Ранее было показано, что основными продуцентами трипсино- и пепсиноподобных протеиназ у карпа являются *L. casei casei* и *L. plantarum*. При этом активность трипсиноподобных протеиназ приблизительно в 10 раз выше, чем пепсиноподобных гидролаз (Jankauskienė, Lesauskienė, 1995). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у исследованных нами бентофагов, особенно у плотвы, уровень пепсиноподобных гидролаз выше, чем у карпа.

Таким образом, выявлены существенные различия температурных характеристик протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам. Характер температурной зависимости протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты, как правило, различен. Относительная активность протеиназ слизистой в зоне низких температур, как правило, не превышает 10% от максимальной активности, энтеральной микробиоты – выше. Наиболее высокие значения этого параметра (30, 38 и 45% от максимальной активности) и наиболее низкие величины $E_{акт}$ выявлены при исследовании протеиназ энтеральной микробиоты у налима, окуня и карася. Протеолитическая активность энтеральной микробиоты и слизистой оболочки у тех же видов рыб при одних и тех же значениях рН различна. Максимальная активность протеиназ слизистой у рыб разных видов наблюдается при рН 10.0, энтеральной микробиоты - в диапазоне рН от 5.0 до 8.0. Полученные данные свидетельствуют о значительной вариабельности характеристик протеиназ энтеральной микробиоты у рыб, различающихся по характеру питания, способствующей адаптации пищеварительной системы рыб к функционированию при низких температурах и в широком диапазоне значений рН.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 09-04-00075).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Извекова Г.И., Извеков Е.И., Плотников А.О. Симбионтная микрофлора рыб различных экологических групп // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. С.728-737.
2. Кузьмина В.В. Физиолого - биохимические основы экзотрофии рыб. М. 2005. 300 с.

3. Кузьмина В.В., Первушина К.А. Влияние температуры и pH на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты рыб // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2004. Т. 40. № 3. С. 214-219.
4. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г. Бактерии желудочно-кишечного тракта и их роль в процессах пищеварения у рыб // Усп. совр. биол. 2002. Т. 122. № 6. С. 569-579.
5. Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Шалыгин М.В. Влияние температуры на активность протеиназ химуса и слизистой оболочки кишечника рыб разных экологических групп // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2008. Т. 44. С. 482-487.
6. Лубянскене В., Вербицкас Ю., Янкавичус К., Лясаускене Л., Грибаускене В., Тряпиене О., Юзоленене Ю., Ястюгинене Р., Бабянскас М., Янкаускене Р. Облигатный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма // Вильнюс. 1989. 191 с.
7. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб. 1993. 238 с.
8. Шивокене Я.С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Моклас. 1989. 223 с. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J.Gen. Phys. 1938. V.22. P.79-83.
9. Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep Å. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and relations with diet // Acta Physiol. Scand. 1997. V. 161 (Suppl. 638). P.67-80.
10. Kuz'mina V. V., Skvortsova E.G., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish // Fish Physiol. Biochem. 2011. V.37. P.345-353.
11. Jankauskienė R., Lesauskienė L. Antagonistic and proteolytic activity of intestinal bacteria of the genus *Lactobacillus* in carps // Biologija. 1995. № 1-2. P. 161-165.

EFFECT OF FEEDING TYPE ON THE CHARACTERISTICS OF PROTEINASES IN FISH ENTERAL MICROBIOTA

V.V.Kuzmina, M.V. Shalygin, G.V.Zolotareva, E.G.Skvortsova, V.A.Sheptitskiy

Significant differences of temperature dependence, E_{act} values and pH function of proteinase of mucosa and enteric microbiota in fish differing in the feeding type. These findings suggest about the adaptation of the investigated proteinases to the functioning at low temperatures and a wide pH range.

ВЛИЯНИЕ ЦЕСТОДНОЙ ИНВАЗИИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТОЛСТОКЛЮВОЙ (*URIA LOMVIA*) И ТОНКОКЛЮВОЙ (*U. AALGE*) КАЙР БАРЕНЦЕВА МОРЯ

М.М. Куклина

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, Мурманск, Россия

e-mail: mm_kuklina@mail.ru

Толстоклювая (*Uria lomvia*) и тонкоклювая (*U. aalge*) кайры – типичные морские колониальные птицы, которые размножаются на скалах побережья и островов северного полушария. Оба вида кайр кормятся в море и добывают пищу в процессе ныряния и активного поиска под водой. Тонкоклювая кайра питается преимущественно рыбой, в то время, как пищевой рацион толстоклювой кайры составляют рыба и ракообразные (Состояние популяций..., 2003). По этим причинам гельминтофауна каждого вида кайр имеет свои особенности. Кроме того, для толстоклювой кайры обычно характерны более высокие значения количественных показателей зараженности по сравнению с тонкоклювыми (Куклин, Куклина, 2005).

Целью данной работы было определение особенностей влияния ленточных червей на биохимические показатели толстоклювой и тонкоклювой кайр.

Материал для настоящей работы собран в ходе береговых экспедиций Мурманского морского биологического института на территории, прилегающей к Гавриловскому архипелагу (Кандалакшский государственный природный заповедник), а также на полуострове Рыбачий в июне-июле 2008 г. В качестве объектов были выбраны толстоклювые (n=20) и тонкоклювые (n=18) кайры. Для биохимических исследований использовали плазму крови и слизистую оболочку кишечника птиц. Отбор проб крови у кайр производили из подкрыльцовой вены. После предварительной обработки материала получали гепаринизированную плазму крови.

Через 3-4 часа после отлова птиц вскрывали и препарировали пищеварительный тракт – вырезали участок двенадцатиперстной кишки, делали продольный разрез выбранного отрезка и снимали слизистую оболочку. Плазму крови и слизистую кишечника замораживали и впоследствии обрабатывали в лабораторных условиях.

В плазме крови измеряли показатели белкового, липидного, углеводного и минерального обменов. Концентрацию общего белка определяли биуретовым методом, а содержание белковых фракций – с помощью электрофореза на бумаге (Камышников, 2000). По методике Г.В.Троицкого путем переосаждения в системе «трихлоруксусная кислота-этанол» измерен уровень модифицированной формы альбумина (Троицкий и др., 1986). Методом осаждения полиэтиленгликоля установили концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) (Лабораторные методы ..., 1987). Активности кислой и щелочной фосфатаз, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), γ -глутамиламинотрансферазы (γ -ГТФ), α -амилазы, а также концентрации мочевины, мочевой кислоты, креатинина, триглицеридов, холестерина, холестерина ЛПВП, глюкозы, кальция, меди и хлоридов измеряли с помощью наборов для биохимических исследований НПТ «Абрис+» (Россия). Уровни общих липидов, меди, фосфолипидов, фосфора неорганического и активность холинэстеразы исследовали биотестами фирмы «Lachema» (Чехия).

В слизистой оболочке кишечника птиц измеряли активность пищеварительных ферментов. Протеолитическую активность (активность трипсина, КФ 3.4.21.4, химотрипсина, КФ 3.4.21.1. и дипептидаз, КФ 3.4.13.1-3.4.13.11) определяли методом Ансона в модификации Л. Н. Алексеенко по приросту тирозина (Алексеенко, 1968; Anson, 1938). В качестве субстратов использовали 1%-ный раствор казеина, приготовленный на растворе Рингера для теплокровных животных. Активность протеолитических ферментов выражали в ммоль тирозина в 1 г ткани за 1 мин. Активность гликозидаз (общая активность амилазы, КФ 3.2.1.1, глюко-амилазы, КФ 3.2.1.3 и мальтазы, КФ 3.2.1.20) измеряли по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). Для определения активности гликозидаз в качестве субстрата использовали 1.8 %-ный раствор крахмала. Скорость гидролиза субстрата выражали в ммоль глюкозы в 1 г ткани за 1 мин.

Одновременно проводили паразитологическое вскрытие птиц и видовую идентификацию найденных гельминтов. Из количественных параметров определены и подсчитаны интенсивность инвазии (ИИ – количество экземпляров данного вида паразита в одной особи хозяина) и индекс обилия (ИО – отношение общего количества экземпляров паразитов к общему количеству обследованных особей птиц) обнаруженных гельминтов.

Впоследствии результаты биохимического анализа сопоставлялись с данными паразитологических вскрытий. Обработка результатов выполнена с помощью пакета анализа данных в среде Excel, достоверность различий между сравниваемыми значениями биохимических параметров оценивали по t-критерию Стьюдента (Матюшичев, 1990).

По результатам паразитологического вскрытия все исследованные птицы разделены на 5 групп. I группу составили толстоклювые кайры, свободные от инвазии, II группу – толстоклювые кайры, зараженные *Alcataenia armillaris* (Cestoda: Dilepididae) с ИИ 1-6 экз. и ИО 1,3 экз., III группу – птицы, инвазированные *A. armillaris* с ИИ 11-64 экз. и ИО 8,45 экз. Незараженные тонкоклювые кайры объединены в IV группу, а тонкоклювые кайры, инвазированные *A. armillaris* с ИИ 2-61 экз. и ИО 3,6 экз. – в V группу. Параметры плазмы крови и слизистой кишечника незараженных кайр использовались как контрольные значения.

Биохимические исследования показателей обмена веществ толстоклювой и тонкоклювой кайр при заражении цестодами не выявило заметных изменений в метаболизме белков. Концентрация общего белка, содержание белковых фракций и модифицированной формы альбумина в плазме крови кайр, инвазированных *A. armillaris*, не отличались от контрольных значений. Активности ферменты белкового обмена (АлАТ, АсАТ, γ -ГТФ) также не изменялись при заражении дилепидами. Уровни небелковых азотистых компонентов плазмы крови (концентрации мочевины, мочевой кислоты и креатинина) у инвазированных кайр соответствовали показателям нормы. Обращает на себя внимание лишь снижение активности щелочной фосфатазы у толстоклювых кайр, зараженных дилепидами, на 30,0% по сравнению с интактными птицами ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ показал, что наиболее заметные изменения отмечены в липидном и углеводном обменах кайр обоих видов, зараженных *A. armillaris*. Показано снижение концентрации общих липидов в плазме крови толстоклювых и тонкоклювых кайр в среднем на 18,2% по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$). Вместе с тем установлено уменьшение содержания триглицеридов в плазме крови толстоклювых 2,0 раза и тонкоклювых кайр в 2,9 раза ($p < 0,05$). Кроме того, уровень глюкозы в плазме крови кайр, зараженных дилепидами, также снижался в среднем на 24,9% ($p < 0,05$). В тоже время активность ЛДГ увеличивалась в плазме крови инвазированных и толстоклювых, и тонкоклювых кайр ($p < 0,05$).

Показатели минерального обмена у кайр, зараженных дилепидами, не отличались от аналогичных параметров птиц, свободных от инвазии.

Активности протеолитических ферментов в слизистой кишечника не имели заметных различий у всех исследованных животных. В то же время установлено, что у зараженных дилепидами толстоклювых кайр активность гликозидаз снижалась на 57,3% ($p < 0,05$).

Известно, что характер изменений обмена веществ при гельминтозах определяется как воздействием паразитов на организм хозяина, так и особенностями ответных реакций самих хозяев. В данной работе выявлено влияние цестодной инвазии *A. armillaris* на ряд показателей липидного и углеводного обменов толстоклювой и тонкоклювой кайр. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что цестодная инвазия вызывает разнообразные изменения в метаболизме липидов и полисахаридов организма хозяина. Влияние заражения гельминтами на обмен липидов и углеводов различных видов животных складывается по-разному и находится в зависимости от интенсивности и длительности инвазии, а также морфологии гельминтов из разных таксономических групп. Так, при экспериментальном дифиллоботриозе установлены существенные изменения в липидном обмене инвазированных хомяков: в печени наблюдалось накопление липидов (общих липидов, холестерина, триглицеридов и фосфолипидов) при одновременном снижении их концентрации в плазме крови (Белова, Слепенков, 1978). Снижение содержания общих липидов и триглицеридов в плазме крови зарегистрировано как для толстоклювой и тонкоклювой кайр, зараженных *A. armillaris*, так и для птенцов моевки при инвазии *Alcataenia larina* (Cestoda: Dilepididae) (Куклина, Куклин, 2011). Авторы предполагают, что выявленные колебания в липидном обмене животных связаны с нарушениями функций печени. По-видимому, продукты метаболизма паразитов оказывают антилипотропное действие на печень, что приводит к накоплению липидов в ней и, как следствие этого, к снижению их уровня в крови. Кроме того, изменения ферментативной активности кишечника под влиянием инвазии ленточных червей также могут способствовать нарушению всасывания липидов и их продуктов распада.

Конкуренция за углеводы между паразитом и хозяином при гельминтной инвазии происходит особенно остро, так как для большинства червей углеводы - это единственный источник энергии (Сопрунов, 1987). Исследования при ряде гельминтозов человека и животных показали, что, помимо нарушения белкового и липидного обменов, наблюдаются также изменения в метаболизме углеводов. Это может быть связано со снижением ферментативной деятельности желудочно-кишечного тракта, нарушениями процесса всасывания в кишечнике продуктов расщепления углеводов, а также с пониженной функцией печени и избирательным потреблением углеводов многими гельминтами. Установленные изменения в углеводном обмене (снижение концентрации глюкозы, увеличение активности ЛДГ в плазме крови, уменьшение активности гликозидаз в слизистой кишечника) инвазированных кайр ранее показаны для некоторых форм дифиллоботриозов. Уменьшение уровня глюкозы в сыворотке крови отмечено у золотистых хомячков, инвазированных *Spirometra erinacei* (Cestoda: Diphylobothriidae) (Hirai et al, 1987). А при экспериментальном исследовании песцов определено, что активность ЛДГ была выше в 2 раза у подопытных животных, чем у контрольных, через 2 месяца после заражения (Аникиева и др., 1988). Изменения в углеводном обмене зараженных животных, по мнению авторов, связано с активацией гликолитических процессов, которые вызваны инвазией. Известно, что уменьшение уровня глюкозы в крови животных влечет за собой активацию процесса глюконеогенеза в печени (образование глюкозы из гликогена печени).

Необходимо заметить, что при инвазии ленточными червями из семейств Dilepididae, Tetrabothriidae, Hymenolepididae морских птиц (моек, серебристых и морских чаек)

активизируются процессы белкового обмена (увеличение концентрации мочевой кислоты), усиливается деятельность иммунной системы (повышение содержания гамма-глобулинов, ЦИК и С-реактивного белка) (Куклина, Куклин, 2006, 2011). В то же время показатели липидного и углеводного обменов, главным образом, соответствовали параметрам нормы. У толстоклювой и тонкоклювой кайр, зараженных дилепидидами, наблюдали обратную тенденцию. Выявленные различия влияния ленточных червей на обмен веществ может объясняться несколькими причинами. Во-первых, толстоклювая и тонкоклювая кайры представляют собой ихтиофагов, рацион питания которых составляет рыба, в то время как морская и серебристая чайки относятся к полифагам, а моевка – к умеренным полифагам. Во-вторых, при поиске и добывании пищи на больших глубинах (в среднем 50-60 м) толстоклювая и тонкоклювая кайры затрачивают значительное количество энергии (Мордвинов, 1996). По всей видимости, обедненная углеводами диета кайр, высокие энергетические затраты птиц при поиске и добычи пищи, а также паразитирование ленточных червей приводят к изменениям в липидном и углеводном обменах.

Авторы выражают благодарность администрации и сотрудникам Кандалакшского государственного природного заповедника за помощь в проведении полевых работ.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 10-04-00204а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Алексеев Л.Н. Определение активности протеиназ по расщеплению белковых субстратов // Современные методы в биохимии. М., 1968. Т. 2. С. 117.
2. Аникиева Л.В., Берестов А.А., Берестов В.А., Гурьянова С.Д., Осташкова В.В. Дифиллоботриоз песцов. Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР, 1988. 143 с.
3. Белова Л.В., Слепенков Ю.Д. Некоторые особенности липидного обмена при экспериментальном дифиллоботриозе // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. 1978. Т. 47, № 3. С. 68–72.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической диагностике. Мн.: Беларусь, 2000. В 2 т. 495 с.
5. Куклин В. В., Куклина М. М. Гельминты птиц Баренцева моря: фауна, экология, влияние на хозяев. Апатиты, 2005. 239 с.
6. Куклина М.М., Куклин В.В. Влияние гельминтной инвазии на биохимические показатели чаек рода *Larus* Баренцева моря // Доклады Академии Наук. 2006. Т. 411, № 2. С. 278–281.
7. Куклина М.М., Куклин В.В. Биохимические аспекты взаимоотношений в системе паразит-хозяин на примере моевки и ленточных червей из разных систематических групп // Доклады Академии Наук. 2011. Т. 438, № 1. С.129–133.
8. Лабораторные методы исследования в клинике. П/ ред. В.В. Меньшикова. М.; Медицина, 1987. 368 с.
9. Матюшичев В.Б. Элементы статистической обработки результатов биохимического эксперимента. Учебное пособие. Л., 1990. 132 с.
10. Мордвинов Ю.Е. Энергетические траты при плавании под водой у некоторых водных птиц // Современная орнитология 1998. М., 1998. С. 285–291.
11. Сопрунов Ф.Ф. Молекулярные основы паразитизма. Наука, Москва, 1987. 223 с.
12. Состояние популяций морских птиц, гнездящихся в регионе Баренцева моря. Под ред. Т. Анкера-Нильссена, В. Бакена, Х. Стрема, А. Н. Головкина, В. В. Бианки, И. П. Татаринковой. Норвежский полярный ин-т., Тромсе, 2003. 206 с.
13. Троицкий Г.В., Борисенко С.Н., Касымова Г.А. Инвертированный метод обработки электрофореграмм для выявления модифицированных форм альбумина // Лаб. дело. 1986. № 4. С. 229–231.
14. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор совр. методов). Л., 1969. С. 187–192.
15. Anson M. The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gener. Phys. 1938. V. 22. P. 79–83.
16. Hirai K., Tsuboi T., Torii M., Nishida H. Carbohydrate metabolism in intact golden hamsters infected with plerocercoids of *Spirometra erinacei* (Cestoda: Diphyllbothriidae) // *Parasitol. Res.* 1987. Vol. 74: P. 183–187.

INFLUENCE OF INVASION BY CESTODES ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THICK-BILLED MURRE (*URIA LOMVIA*) AND COMMON MURRE (*U.AALGE*) OF THE BARENTS SEA

M.M. Kuklina

The comparative analysis of biochemical parameters at thick-billed murre (*Uria lomvia*) and common murre (*U.aalge*), infected by cestodes *Alcataenia armillaris* (Cestoda: Dilepididae) and noninfected was carried out. Negative impact of tape-worms *A. armillaris* on a metabolism in an organism of thick-billed and common murre was shown. It was established, that concentrations of the total lipids, the triglycerides and the glucose in plasma of blood and the activity of glycosidase in mucous membrane were decreased. Also activity of the lactatdehidrogenase was increased in plasma of blood of infected birds.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ К АНТРОПОГЕННЫМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Н.В.Кулева

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Исследование механизмов адаптации гидробионтов к загрязняющим веществам предполагает комплексное использование структурных, эндокринологических, протеомных и эпигенетических подходов. Развитие новой биотехнологии – протеомики – дает шанс получения большого количества достоверной информации о механизмах действия факторов внешней среды на гидробионтов и возможность оценки их устойчивости к этим факторам. Протеомика имеет дело с количественными и качественными изменениями белков внутри определенных протеомов или субпротеомов. Термин «протеом», обозначающий белковый компонент генома (в английской транскрипции: proteom is entire PROTEin complement expressed by the genOME), впервые прозвучал в докладе Международной конференции “2D-Electrophoresis: from Peptide Maps to Genomes” в Италии в 1994 году. Теперь термины «протеом» и «протеомика» стали общепринятыми.

Стратегию протеомных исследований для какого-либо объекта можно представить в виде последовательно реализуемых этапов, ключевые позиции среди которых занимают методы двухмерного электрофореза или жидкостной хроматографии и идентификации разделенных белков с помощью масс-спектрометрии составляющих их пептидов при использовании соответствующих компьютерных банков данных, хранящих информацию о наборах пептидов для отдельных белков. Роль современной протеомики можно определить как интегральный анализ функционального состояния генома на уровне белковых продуктов генной экспрессии, включающий их посттрансляционные модификации.

Антропогенные загрязнения окружающей среды негативно действуют на живые организмы. Однако при длительной экспозиции организм может приобрести устойчивость двух типов: физиологическую (кратковременную), связанную с его внутренними механизмами, и наследуемую, которая передается следующему поколению на основе генетических и/или эпигенетических механизмов. В основе обоих типов устойчивости лежат гомеостатические процессы, направленные на уменьшение концентрации свободных поллютантов в клетках, предотвращающие или ограничивающие те их взаимодействия, которые могут нанести вред организму. Это может быть индукция систем монооксигеназ, металлотионеинов, антиоксидантных ферментов, а также активации систем репарации для белков или нуклеиновых кислот. Применение протеомики позволяет идентифицировать появление новых белковых компонентов в клетке или увеличение их количества.

Благодаря постоянному контакту с водной средой и донными отложениями, главным резервуаром загрязнителей водной среды, двустворчатые моллюски являются самыми популярными индикаторными видами среди гидробионтов. Причина лежит в их широком географическом распространении, обилии видов, легкости идентификации, сидячему образу жизни и фильтрующему типу питания. Они часто являются толерантными к химическому загрязнению и могут аккумулировать и биоконцентрировать поллютанты в своих тканях.

При проведении протеомного анализа влияния поллютантов на моллюсков *Chamaelea gallina* их экспонировали с модельными ксенобиотиками, затем из тканей целых моллюсков была получена цитоплазматическая фракция, с белками которой был проведен двумерный электрофорез. Белки разделяли по двум характеристикам: изоэлектрической точке и молекулярной массе. Визуализированные на полиакриламидном геле путем окрашивания белки представляют собой профиль белковой экспрессии (ПБЭ), при сравнении экспериментального и контрольного ПБЭ были обнаружены изменения в интенсивности окрашивания у 15 белков из которых 3 были идентифицированы как тропомиозин, легкие цепи миозина и актин.

Анализ обнаруженных изменений в экспрессии белков привел к заключению об окислительном стрессе (ОС) как механизме влияния меди, мышьяка и полихлорированных бифенилов на моллюсков (Rodriguez-Ortega et al., 2003).

Исследование экстрактов жабр китайского краба *Eriochoer sinensis*, экспонированного с кадмием, обнаружило различие 6 белков в остром опыте и 31- в хроническом (Silvestre et al., 2006). Было идентифицировано 15 белков: цитоскелетные белки, катепсин D, члены тиоредоксинового суперсемейства: глутатиотрансферазы, протеиндисульфидизомераза. Эти результаты также были интерпретированы как участие кадмия в активации ОС. При этом отмечено уменьшение экспрессии фермента глицеральдегид -3-фосфатдегидрогеназы. Интересно, что на другой модели - моллюске *Schobicularia plana* - при экспонировании с кадмием экспрессия этого фермента увеличивалась. Таким образом, оказывается, что результаты протеомного анализа для опытов с различными видами животных и в разных условиях могут быть неоднозначными.

Важным наблюдением в опытах по изучению ПБЭ моллюсков является очевидная стабильность протеома моллюсков при воздействии ксенобиотиков. В большинстве случаев из примерно 2000 пятен, видимых на электрофореграмме, не более 20-40 пятен меняют свою интенсивность. Это позволяет предположить, что протеом моллюсков очень устойчив в отношении абсолютных количеств белка.

Еще одним подходом протеомики, применяемом к гидробионтам, является изучение изменений в химическом статусе белков. Привлекательными мишенями являются химические модификации белков, возникающие при ОС: карбонилирование, глутатионилирование и изменение статуса дисульфидных связей.

Профиль карбонилированных белков можно получить с помощью Вестерн-блоттинга, используя антитела на динитрофенол, который связывается с СО-группами белков. У мидии *Mytilus edulis* ОС приводил к карбонилированию примерно 40 белков в жабрах и пищеварительной железе при практически неизменном ПБЭ (McDonagh et al., 2005). В качестве мишени карбонилирования и глутатионилирования был идентифицирован цитоскелетный актин. Позже был изолирован весь субпротеом карбонилированных белков.

Карбонилирование является необратимой окислительной модификацией, которая не подвергается репарации ферментами. Белки, окисленные при слабом ОС, могут быть деградированы 20S-протеосомами, среднеокисленные белки расщепляются протеазами клетки. Сильный ОС дает белки с высокой степенью карбонилирования, которые не могут расщепляться и имеют тенденцию к агрегации. Именно такие агрегаты были получены в нашей работе с очищенным актином из мышц ноги беломорских мидий *Mytilus edulis*, которых в течение 6 дней в лабораторных условиях выдерживали с ионами меди концентрации 1 мг/мл. Оказалось, что ионы меди вызывают значительное карбонилирование актина ноги, сопровождающееся образованием поперечно-сшитых олигомеров и укороченных мономеров. Эти карбонилированные структуры актина и соответствующие им изменения в тесте "подвижность in vitro" могут быть биомаркерами для оценки качества водной среды (Vikhoreva et al., 2009).

Обнаружение окислительных модификаций белков другого гидробионта *Ruditapes decussates* в его пищеварительной железе при экспозиции с известным стабильным метаболитом DDT дихлордифенилдихлорэтиленом (DDE) в концентрации 40 мкг/литр (Dowling et al., 2006) позволило идентифицировать ОС как основной механизм действия DDE на гидробионтов.

Интересно, что окислительные модификации белков являются маркерами не только отрицательных последствий действия активных форм кислорода (необратимой модификации и потери функции белка), но и положительных: обратимая модификация белка превращается в

регуляторный ответ. Обратимые окислительные модификации белков приводят к изменению их функций и взаимодействий с другими белками. Примерами таких модификаций могут быть образование из сульфгидрильных групп внутри- и межмолекулярных дисульфидов, окисление их до сульфеновой или сульфиновой кислот, нитрозилирование, образование тиолятов (например, с цистеином или глутатионом). Известно, что глутатионилирование актина приводит к торможению его полимеризации, образование внутренних дисульфидов у регуляторной субъединицы протеинкиназы А – к ее активации, присоединение цистеина к протеинкиназе С - к изменению ее активности (Eaton et al., 2006).

Одним из подходов протеомики, позволяющем выявить белки, образующие при ОС межмолекулярные дисульфидные связи, является “диагональный” электрофорез. Это двумерный электрофорез, но при его проведении в одном направлении разделяют по молекулярной массе окисленные белки, а затем их восстанавливают и разделяют по молекулярной массе в другом направлении. Белки, способные к обратимому восстановлению дисульфидных связей, располагаются с левой стороны от диагонали, образованной белками, которые не изменились под действием восстановителей. Редокс белки идентифицируют с помощью масс-спектрометрии. Применение диагонального электрофореза для оценки влияния таких загрязнителей как медь и бензин показало значительное увеличение образования дисульфидных связей между цитоплазматическими белками из жабр балтийских мидий *Mytilus edulis* при действии меди (9 пятен) и меньшее под действием бензина (3 пятна) (Prevodnik et al., 2007). В нашей работе, посвященной ОС, вызванному рентгеновским облучением, диагональный электрофорез обнаружил значительное увеличение количества дисульфидных связей для таких белков, как актин, креатинкиназа и различные формы легких цепей миозина (Fedorova et al., 2009).

Широко известным белком, изменяющим свои функциональные свойства под действием обратимого S- нитрозилирования, является рианодинорный рецептор1, представляющий канал для освобождения кальция, запускающего сокращение скелетных мышц. Недавно с помощью подходов протеомики были идентифицированы конкретные остатки цистеина, которые участвуют в функциональных ответах на различные ред-окс модификации (Aracena-Parks et al., 2006).

Окислительно-восстановительный статус клетки может модифицировать функции ядерного фактора NF-κB, активность которого в отношении связывания с ДНК может быть ингибирована при ОС и нитрозативном стрессе. С помощью протеомного подхода было показано, что модификациями, изменяющими свойства этого фактора, могут быть глутатионилирование или образование сульфеновой кислоты в его субъединице p50. Эти посттрансляционные модификации могут представлять молекулярный базис для сопряжения прооксидантных стимулов с экспрессией генов (Pineda-Molina et al., 2001).

Таким образом, в работе рассмотрено применение протеомики для оценки изменений в состоянии генома гидробионтов при действии антропогенных факторов по изменению профилей белковой экспрессии и окислительных модификаций. Показано, что профиль белковой экспрессии моллюсков достаточно стабилен при воздействии антропогенных ксенобиотиков. Показателем окислительного стресса в клетках гидробионтов являются окислительные модификации белков: необратимые (карбонилирование) или обратимые (образование дисульфидов, глутатионилирование, нитрозилирование). Последние могут изменять функциональные свойства белков, преобразуя оксидативный сигнал в регуляторный ответ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aracena-Parks P., Goonacekera S.A., Gilman C.P. Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation and oxidation to disulfides in ryanodine receptor type1 // *J.Biol.Chem.* 2006. V. 281. P. 40354-40368.
2. Dowling V., Hoarau P., Romeo M. et al. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes desussatus* following DDE exposure // *Aquat.toxicol.* 2006. V. 77. P. 11-18.
3. Eaton P. Protein thiols oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures // *Free Radic.Biol.Med.* 2006. V. 40. P. 1889-1899.
4. Fedorova M., Kuleva N., Hoffmann R. Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress // *Biochim.Biophys.Acta.* 2009. V.1792. P. 1185-1193.

5. McDonagh B., Tyther R., Sheehan D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in blue mussel *Mytilus edulis* by proteomic analysis and Western blotting // *Aquat. Toxicol.* V. 73. P.315-326.
6. Pineda-Molina E., Klatt P., Vazquez J. et al. Glutathionylation of the p50 subunit of NF- κ B, a mechanism for redox induced inhibition of DNA binding // *Biochemistry.* 2001. V.40. P. 14134-14142.
7. Prevodnik A., Gasdestrom J., Lija K. et al. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* // *Aquat. Toxicol.* 2007. V. 82. P. 63-71.
8. Rodriguez-Ottega M., Grosvik B.E., Rodriguez-Aziza A. et al. Changes in protein expression profiles in bivalve mollusks (*Chamelea gallina*) exposed to fore model environmental pollutants // *Proteomics.* 2003. V. 3. P. 1535-1543.
9. Silvestre F., Dierick J.F., Dumont V. et al. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sientis* during acclimation to cadmium // *Aquat. Toxicol.* 2006. V. 76. P. 46-58.
10. Vikhoreva N., Vikhorev P., Fedorova M., Hoffmann R., Mansson A., Kuleva N. The *in vitro* motility assay parameters of actin filaments from *Mytilus edulis* exposed *in vivo* to copper ions // *Archiv. Biochem. Biophys.* 2009. V. 491. P. 32-38.

APPLICATION OF PROTEOMICS FOR THE ASSESSMENT OF HYDROBIONTS ADAPTATION TO ENVIRONMENTAL ANTHROPOGENIC FACTORS

Kuleva N.V.

Application of proteomics approaches for the assessment of hydrobiont adaptation to environmental factors was considered on studies of protein expression and oxidative modification profiles. Profiles of protein expression of mollusks did not change much in response to antropogenic xenobiotics. Environmental factors action is accompanied by oxidative modifications which may be irreversible (as carbonylation) damaging structure and function of protein and reversible able to change protein functional properties and to transform oxidative signal into regulatory response.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ANODONTA CYGNEA

С.В. Кулько

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород,
Россия, e-mail: Psychonautica@inbox.ru*

В современных условиях среды, постоянно подвергающейся антропогенному воздействию, особенно остро встает проблема адаптации животных к изменению условий мест обитания. Рядом работ отечественных и зарубежных ученых (Заварзин, 1985; Стадниченко, 1981; Adamowicz, Wolaczek, 2003) рассмотрено и показано разнообразие форм и многообразие функций, выполняемых гемоцитами (форменными элементами гемолимфы) моллюсков. Изучена морфология клеточных элементов гемолимфы отдельных моллюсков (Хлус, 2003; Adamowicz, Wolaczek, 2003; Wosmotton, Pipe, 2003). Однако, морфологические особенности гемоцитов *in vitro*, их поведение, активность, а также способность образовывать псевдоподии рассмотрены недостаточно полно.

Целью данной работы явилось изучение морфологических особенностей различных типов гемоцитов двустворчатых моллюсков *Anodonta cygnea*.

Для проведения исследования использовали половозрелых моллюсков *A. cygnea*, собранных в р. Везелка в апреле 2012 г. Гемолимфу моллюсков отбирали стандартным методом. Полученную гемолимфу собирали при помощи микропипетки в пластиковую чашку Петри, и затем изучали на инвертированном оптическом микроскопе Nikon Digital Eclipse Ti-E при помощи программного обеспечения Nis-Elements Basic research (NIKON INSTRUMENTS INC., USA).

В результате исследования гемолимфы *A. cygnea* под инвертированным оптическим микроскопом было выявлено четыре типа гемоцитов. Результаты измерений представлены в Таблице 1.

Табл. 1. Округлые клетки (средний размер – 7,29 мкм), с тонкими филоподиями. Клетки этого типа закрепляются на субстрате, но остаются умеренно подвижными в течение всего времени наблюдения. Выпускают псевдоподии, имеющие вид филоподий и ризоподий.

Фагоцитарной активности не проявляют, но способны участвовать в инкапсуляции крупных объектов.

Тип 2. Аморфные клетки, (средний размер – 7,93 мкм), образующие лобоподии. Проявляют выраженную фагоцитарную активность в отношении инородных объектов. При внесении супернатанта дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) гемоциты данного типа начинают быстрое движение к инородным клеткам. Передвижение такой клетки осуществляется за счет изменения формы клетки, перетекания цитоплазмы с ядром в сливающиеся лобоподии.

Таблица 1. Результаты измерений размеров гемоцитов *A. cygnea* разных типов.

| Клетки | Тип 1, мкм | Тип 2, мкм | Тип 3, мкм | Тип 4, мкм |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 7,311828 | 7,741935 | 6,021505 | 6,451613 |
| 2 | 6,021505 | 10,75269 | 3,655914 | 6,021505 |
| 3 | 7,311828 | 8,817204 | 5,376344 | 6,451613 |
| 4 | 5,591398 | 8,387097 | 6,666667 | 7,526882 |
| 5 | 7,096774 | 8,387097 | 5,806452 | 8,172043 |
| 6 | 6,236559 | 9,462366 | 7,526882 | 10,75269 |
| 7 | 6,88172 | 6,021505 | 6,666667 | 7,526882 |
| 8 | 5,806452 | 9,892473 | 7,956989 | 9,032258 |
| 9 | 10,10753 | 8,817204 | 7,741935 | 7,311828 |
| 10 | 10,53763 | 9,247312 | 7,755935 | 6,471413 |
| Среднее | 7,290322 | 7,935484 | 6,517529 | 7,571873 |

Тип 3. Круглые клетки (средний размер – 6,51 мкм): имеют относительно небольшой размер, псевдоподий не образуют, либо образуют очень короткие и тонкие филоподии. Клетки этого типа на стекле не закрепляются, постоянно находятся в толще жидкости. Фагоцитарную активность не проявляют.

Тип 4. Продолговатые клетки (средний размер – 7,57 мкм). Образуют псевдоподии, несколько лобоподий на одном из полюсов клетки и множественные филоподии по контуру. В течение наблюдения могут незначительно поменять форму, главным образом за счет изменения количества и размера (толщины) лобоподий. Фагоцитарную активность не проявляют.

Результаты исследования подтверждают точку зрения, что элементами защитных реакций двустворчатых моллюсков являются циркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты. Это подтверждается изменением функциональной активности гемоцитов при воздействии чужеродных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Заварзин А.А. Основы сравнительной гистологии. Л.: Ленинградский университет. 1985. 400 с.
2. Стадниченко А.П., Стадниченко Ю.А. О воздействии личинок горчака на пластинчатожаберного моллюска *Unio rostratus gentilis* Naas. // Гидробиол. журн. Т. 17, 1981, № 5. С. 57-61.
3. Хлус Л.М. Цитологічна характеристика гемолімфи *Helix lutescens* Rssm. та *Helix albescens* Rssm. у різних фізіологічних станах // Клінічна та експериментальна патологія. Т. 2, 2003. № 1. С. 89-92.
4. Adamowicz A., Bolaczek M. Blood Cells Morphology Of The Snail *Helix Aspersa Maxima* (Helicidae). // *Zoologica Poloniae*. 2003. V. 48/1–4. P. 93-101.
5. Wootton E.C., Pipe R.K. Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc *Scrobularia plana*. // *Fish and Shellfish Immunology*. 2003. V. 15. Issue 3. P. 249-262.

MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF BIVALVE MOLLUSCS ANODONTA CYGNEA HAEMOCYTES.

Kulko S.V.

Investigation deals with the problem of morphofunctional features of bivalve mollusks *A. cygnea* haemocytes. In this article described the presence in haemolymph four types of haemocytes. Two of them is capable for phagocytosis and encapsulation of large foreign objects, falling into the haemolymph. Results of study support the view, that the haemocytes are the elements of protective and adaptive reactions of bivalve mollusks.

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ РОЛЬ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КИШКИ ГОЛОТУРИИ *E. FRAUDATRIX*

Ламаш Н.Е., Долматов И.Ю.

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

E-mail: ninalamash@yandex.ru

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков соединительной ткани в норме и при патологии (Massova et al., 1998; Bellayr et al., 2009). У иглокожих ММП впервые были обнаружены в развивающихся эмбрионах, гонадах и спикулах морских ежей (Vafa et al., 1996; Sharpe, Robinson, 2001; Ranganathan et al., 2004). Полагают, что они регулируют процессы гастрюляции и формирования гиалинового слоя, а также рост спикул у этих животных. Известно также, что активность ММП увеличивается при регенерации кишки голотурии *Holothuria glaberrima* (Quinones et al., 2002). В последних молекулярно-генетических работах по голотуриям была выявлена активность четырех генов – *MMP-11*, *MMP-14*, *MMP-15*, *MMP-17*, кодирующих соответствующие матриксные металлопротеиназы, но сами белки не идентифицированы (Ortiz-Pineda et al., 2009). Ранее нами было установлено, что у голотурий *Eupentacta fraudatrix* процесс регенерации внутренних органов после эвисцерации сопровождается интенсивной перестройкой внеклеточного матрикса соединительнотканного утолщения и всего мезентерия (Garcia-Ararras, Dolmatov, 2010). На основании наблюдаемых морфологических изменений было выдвинуто предположение о возможном участии ММП в регенерации внутренних органов у этого вида голотурий. В этой связи в данной работе мы попытались выявить и охарактеризовать протеиназы в мезентерии регенерирующей кишки голотурии *E. fraudatrix*.

Исследования проводили на половозрелых особях голотурий *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirotida), собранных в заливе Петра Великого Японского моря. Сразу после отлова и во время экспериментов животных содержали в аквариумах. Для получения гомогената животных вскрывали и под биноклем вырезали кусочки мезентерия в области формирования зачатка кишки. Навеску ткани, полученную из 10-15 животных гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора при 4°C в 50 мМ Трис-НСI буфере (рН 7.5), содержащем 1% Тритона X-100. Гомогенат инкубировали на холоде в течение 30 мин, повторно гомогенизировали и центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин, 4°C. Супернатант использовали в дальнейших экспериментах. Активность протеиназ исследовалась методом прямой зимографии с предварительным вертикальным электрофорезом (напряжение - 150В, 2 ч.) супернатанта гомогената мезентерия в 10% полиакриламидном геле, содержащем 0,1% Na-SDS с добавлением 0,1% коллагена IV (желатин) или казеина или коллагена I. Гели окрашивали в 2,5% Coomassie Blue R-250 в 50% метаноле и 10% ледяной уксусной кислоте. Присутствие протеиназ определяли по наличию неокрашенных полос на зимограмме.

В мезентерии голотурии *E. fraudatrix* обнаружены 4 белка с протеолитической активностью в отношении желатина. Молекулярные массы протеиназ были 132, 58, 53 и 47 кДа (рис. 1А). Сравнительный анализ протеолитической активности белков одного и того же гомогената на зимограммах с денатурированным коллагеном IV, коллагеном I и казеином показал, что ни один из выявленных белков не вызывал гидролиза казеина. На зимограммах с коллагеном I выявлялись четыре зоны лизиса, соответствующие белкам с такими же молекулярными массами, как и на гелях с желатином. Однако при равных условиях белки 132 и 47 кДа активнее разрушали коллаген I, а белок 58 кДа - желатин (рис. 1В). Известно, что коллаген I относится к группе интерстициальных коллагенов, а коллаген IV является составляющей единицей базальных мембран. Отмеченная нами способность желатиназ разрушать коллагены обоих типов, а также отсутствие каталитической активности в отношении казеина указывают на возможную функцию этих белков как внеклеточных протеиназ. Выявленные различия в активности ферментов по отношению к коллагену и желатину свидетельствуют о разной субстратной специфичности и, возможно, разных функциях этих белков в организме.

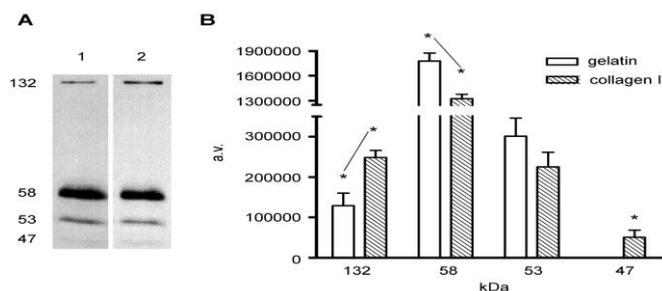


Рис. 1. Влияние субстрата на активность протеиназ мезентерия. А – инвертированное изображение зимограмм с желатином (1) и коллагеном I (2), цифры – молекулярные массы протеиназ, kDa. В – денситометрический анализ зимограмм с желатином (gelatin) и коллагеном I (collagen I), a.u. – условные единицы плотности зоны лизиса.

Протеолитическая активность всех белков полностью ингибировалась в присутствии 5 мМ ЭДТА. Аналогичный эффект наблюдали при инкубации гелей в среде, содержащей избирательный хелатор ионов кальция, ЭГТА (5 мМ). Тиолмодифицирующий агент ДТТ (2 мМ) полностью ингибировал активность белков 58, 53 и 47 кД и на 80% снижал литическую активность белка 132 кДа. Необратимый ингибитор сериновых и треониновых протеаз – ФМСФ не влиял на желатинолитическую активность белков 58, 53 и 47 кД и незначительно (10–15%) снижал активность белка 132 кД. В то время как ингибитор цинк-зависимых металлопротеиназ – 1,10-фенантролин (2 мМ) полностью подавлял ферментативную активность белков 58, 53 и 47 кД и снижал активность белка 132 кД. Известно, что фенантролин может ингибировать не только матриксные металлопротеиназы, но и некоторые цинк-зависимые аминопептидазы. В наших экспериментах, селективный ингибитор аминопептидаз – бестатин, полностью подавлял литическую активность белков 132, 53 и 47 кД гомогената зачатка кишки и на зимограмме с желатином выявлялся только белок 58 кДа. Таким образом, эксперименты с ингибиторами показали, что только протеиназа 58 кД является матриксной металлопротеиназой, подобной ММП позвоночных животных, тогда как протеиназы 132, 53 и 47 кД относятся к группе цинк-зависимых металлопротеиназ, но для более точной идентификации этих ферментов необходимы дополнительные исследования.

Для типичных ММП характерной особенностью является активация профермента тиолмодифицирующими агентами, которые дестабилизируют связь между ионом цинка активного центра и остатком цистеина, что приводит к химической активации профермента (Nagase, Woessner, 1999). В наших экспериментах ДТТ полностью подавлял литическую активность протеиназы 58 кД. Эти данные указывают на то, что механизм регуляции ММП 58 кДа отличается от такового ММП позвоночных животных. Выявленный нами ингибирующий эффект ДТТ на все протеиназы свидетельствует о существенном значении SH-групп в проявлении активности этих ферментов.

У голотурий основой регенерации кишки после эвисцерации является перестройка внеклеточного матрикса кишечного мезентерия, которая может происходить при участии протеиназ. Эвисцерацию у голотурии *E. fraudatrix* инициировали введением в полость тела дистиллированной воды. Выброс внутренностей происходил через передний конец тела. При этом удалялась большая часть внутренних органов: аквафарингеальный комплекс (АК), в который входят нервное окологлоточное кольцо, кольцевые сосуды амбулакральной и гемальной систем, щупальца, а также вся пищеварительная система, за исключением клоаки. В полости тела после эвисцерации сохранялась гонада, органы дыхательной системы голотурий, клоака и кишечный мезентерий. Регенерация всех утраченных структур в летние месяцы занимала около месяца. На основании морфологических изменений мы выделяем 8 стадий регенерации. Восстановление начинается с образования тромба на переднем конце животного. На первой стадии (1 сут после эвисцерации) тромб замещается внеклеточным матриксом. На второй стадии (2-3 сут) на переднем конце голотурии формируется соединительнотканное утолщение, которое представляет собой зачаток АК. На третьей стадии (4-5 сут) по краю мезентерия начинает отрастать передний зачаток кишки. В течение четвертой стадии (7 сут) он удлиняется. На этой стадии начинается формирование кишечной выстилки за счет клеток мезотелия, мигрирующих в

центральную часть зачатка. На пятой стадии (8-10 сут) задний зачаток становится заметным. На шестой стадии (14 сут) основные структуры АК сформированы и происходит их линейный рост. Передний зачаток кишки продолжает расти по краю мезентерия назад и к этой стадии достигает середины тела. Он отрастает от клоаки и распространяется по краю мезентерия. На седьмой стадии (16-18 сут) зачатки соединяются, и целостность кишки восстанавливается, а на восьмой стадии (25-30 сут) животное начинает питаться.

С целью выявления изменений в активности протеиназ при регенерации мы использовали метод количественного электрофореза с последующей зимографией (рис. 2А). Денситометрический анализ зимограмм показал, что активность ферментов меняется в процессе восстановления. Так на стадии 1 наблюдали статистически достоверное увеличение активности высокомолекулярного белка 132 кДа (рис.2В), в то время как активность остальных протеиназ существенно не изменялась. Повышение уровня активности белков 53 и 58 кДа отмечали на стадии 2. На стадии 4 их высокая активность сохранялась, в то время как протеолитическая активность белка 132 кД снизилась до исходного уровня и уже не изменялась до конца эксперимента (стадия 6). На стадии 6 происходило снижение активности протеиназы 53 кДа, а активность белка 58 кДа уменьшилась, но была достоверно выше, чем у нерегенерирующих животных. Таким образом, нами установлено, что первых стадиях регенерации происходит активация протеиназы 132 кД, тогда как активность низкомолекулярных протеиназ увеличивается на стадиях формирования кишечной выстилки и миграции клеток (стадии 2-4). Для выяснения роли протеиназ в регенерационном процессе было проведено два эксперимента по блокированию протеиназ фенантролином. В первом опыте 20 животным ежедневно в течение 10 дней вводили в полость тела раствор фенантролина начиная с 3 сут после эвисцерации, в то время когда начинали активироваться низкомолекулярные желатиназы. Контрольной группе из 20 голотурий вводили в течение того же времени морскую воду. После этого по 10 животных из каждой группы были зафиксированы и вскрыты для установления стадии регенерации. Оказалось, что все голотурии контрольной группы находились на стадии 5. Тогда как животные, которым вводили фенантролин, отставали в развитии, все они были на стадии 3. Оставшихся животных как контрольной, так и опытной групп содержали в аквариуме еще 14 дней без введения агента. Оказалось, что у контрольных и опытных животных сформировался нормальный кишечник. По морфологии внутренних органов голотурии обеих групп не отличались друг от друга и находились на восьмой стадии регенерации.

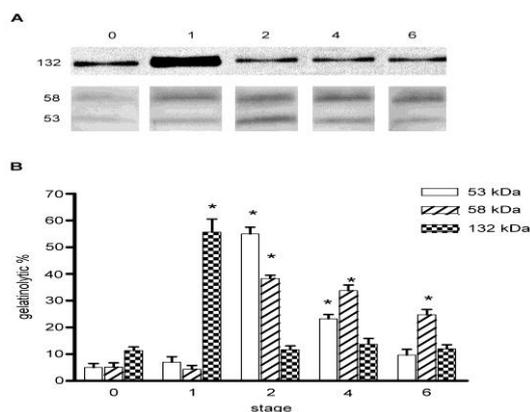


Рис. 2. Динамика активности протеиназ мезентерия голотурии в процессе регенерации. А – инвертированное изображение зимограмм гомогенатов мезентерия голотурий до эвисцерации (0) и на разных стадиях регенерации (stage 1, 2, 4 и 6). В - денситометрический анализ после горизонтального сканирования зон лизиса. Результаты представлены как средние значения \pm SE из 6 зимограмм, соответствующих 3 зимограммам из 2 разных гомогенатов (*, $p \leq 0,01$ по сравнению с 0 сут, $n=6$).

В другом эксперименте опытной группе раствор фенантролина начинали вводить через 1 сут после эвисцерации, когда активность протеиназы 132 кДа максимальна. Уже через 7 сут после начала введения агента было заметно ухудшение состояния опытных животных. Тело голотурий

было раздуто, амбулакральные ножки втянуты, животные не прикреплялись к стенке сосуда. Через 12 сут после эвисцерации опытные животные находились на ранней стадии восстановления (стадия 1). Несмотря на то, что опытным животным перестали вводить блокатор, через 4–5 сут они погибли. Голотурии из контрольной группы нормально развивались, регенерация у них проходила без отклонений. Наши данные показали, что блокировка активности протеиназ оказывает заметное воздействие на регенерацию внутренних органов у голотурии *E. fraudatrix*. При этом степень влияния зависит от времени начала введения фенантролина. Если блокировка протеиназ начинается на второй стадии регенерации, темпы восстановления замедляются почти в 2 раза. Однако такое воздействие обратимо и при отмене блокатора скорость регенерации у опытных животных происходит опережающими темпами. Наши результаты согласуются с данными, ранее полученными на голотурии *H. glaberrima* (Quinones et al., 2002). В то же время, если блокировать протеиназы на ранних стадиях сразу после эвисцерации, то регенерация полностью останавливается и животные погибают. Вероятно, ранняя активация протеиназ является критичной для запуска восстановительного процесса у голотурий.

Работа поддержана грантом Правительства России №11.G34.31.0010, грантом РФФИ №. 11-04-00408.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bellayr I.H., Mu X., Li Y. Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments //Future Med Chem. 2009. V. 1(6). P. 1095–1111.
2. Garcia–Arraras J.E., Dolmatov I.Yu. Echinoderms: Potential model systems for studies on muscle regeneration //Curr. Pharm. Design. 2010. V.16. P. 942–955.
3. Massova I, Kotra L.P., Fridman R., Mobashery S. Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification //FASEB. 1998. № 12. P. 1075–1095.
4. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases //J. Biol. Chem. 1999. № 274. P. 1491–21494.
5. Ortiz–Pineda P.A., Ramírez–Gómez F., Pérez–Ortiz J. et al. Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber //BMC Genomics. 2009. V. 10. P 262–264.
6. Quinones J.L., Rosa R., Ruiz D.L. et al. Extracellular matrix remodeling and metalloproteinase involvement during intestine regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* //Devel. Biol. 2002. V. 250. P 181–197.
7. Ranganathan L., Rimsay R., Robinson J.J. Zymogen activation and characterization of a major gelatin–cleavage activity localized to the sea urchin extraembryonic matrix //J. Cell Biochem. 2004. V. 93(6). P. 1075–1083.
8. Sharpe C., Robinson J.J. Characterization of matrix metalloprotease activities induced in the sea urchin extraembryonic matrix, the hyaline layer //Biochem. Cell Biol. 2001. V. 79(4). P. 461–468.
9. Vafa O., Goetzl L., Poccia D., Nishioka D. Localization and characterization of blastocoelic extracellular matrix antigens in early sea urchin embryos and evidence for their proteolytic modification during gastrulation //Differentiation. 1996. V. 60. P. 129–138.

MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR ROLE IN THE REGENERATION PROCESSES OF HOLOTHURIANS *E. FRAUDATRIX*

Lamash N.E., Dolmatov I.Yu.

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the FEB RAS, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, e-mail: ninalamash@yandex.ru

Four proteases with molecular masses of 132, 58, 53, and 47 kDa were isolated from the digestive system of the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. These proteases displayed the gelatinase activity and characteristics of zinc metalloproteinases. The 58 kDa protease had similar protease inhibitor sensitivity to that of mammalian matrix metalloproteinases. All four proteases were differentially active during intestine regeneration in the holothurian. The 132 kDa protease showed the highest activity within 24 hours of injury. The inhibition of gelatinase activity by phenanthroline during this period resulted in the complete inhibition of regeneration and death of the holothurian. During morphogenesis (stages 2–4 of regeneration), the highest activity was measured for the 53 and 58 kDa proteases. When the enzymes were inhibited by phenanthroline, regeneration was retarded at stage 2. Withdrawal of the inhibitor restored the normal rate of regeneration, and the organs developed normally. The role of the isolated proteases in the regeneration processes of holothurians is discussed.

NO-ЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В БОЛЕВЫХ РЕАКЦИЯХ ПРИБРЕЖНЫХ КРАБОВ, ОБИТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Ламаш Н.Е., Коцюба Е.П., Дюйзен И.В.

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Дальневосточный федеральный университет, г.Владивосток, Россия
e-mail: ninalamash@yandex.ru

В последние годы появляется все больше данных свидетельствующих о наличии у беспозвоночных специфических нейрохимических систем, которые участвуют в восприятии боли. Однако до сих пор мало что известно о роли оксида азота в локальных нейронных сетях, которые участвуют в ноцицептивных реакциях беспозвоночных животных.

Цель настоящего исследования – изучение динамики активности NO-ергической системы мозга при остром стрессовом воздействии у прибрежных крабов, обитающих в различных экологических условиях.

Исследования выполнены на взрослых особях прибрежного краба *Hemigrapsus sanguineus* (Grapsidae, Decapoda), отловленных в одном из наиболее загрязненных районов Японского моря – в Амурском заливе (станция 1). Контролем служили особи из чистой зоны западного побережья острова Русский (станция 2). Перед экспериментом животных с каждой станции делили на группы - интактную, контрольную и экспериментальную. Формирование острой стрессовой ситуации проводили с помощью формалинового теста (Okuda et al., 2001), специально адаптированного нами для ракообразных. Экспериментальным животным в правую клешневую конечность в область проподита на уровне сочленения дактило-проподит инъекцировали 1% формалин на физиологическом растворе. Контрольным животным в том же объеме вводили физиологический раствор. После инъекции животных помещали в прозрачные аквариумы для регистрации поведенческих реакций. Продолжительность регистрации поведенческих реакций составляла 12 ч. Для изучения локализации НАДФН-диафоразы (NADPH-d: К.Ф.1.6.99.1) использовали тетразолиевую реакцию. Количественное определение NO-синтазы в гомогенатах ткани мозга проводили методом иммуноблотинга. Суммарное содержание нитратов и нитритов в гемолимфе крабов определяли спектрофотометрическим методом. Статистический анализ осуществляли с помощью статистико-графической программы GraphPadPrizm (версия 4.00).

У всех интактных животных, независимо от условий их обитания NADPH-d/NO активность выявляется в мозге и в брюшном ганглии. В мозге продукт гистохимической реакции локализовался преимущественно в ольфакторном дейтоцеребруме, а в брюшном ганглии - в нейропилях и в волокнах проводящих путей в подглоточном, грудном и абдоминальном сегментарных ганглиях. Сравнительный анализ показал, что у крабов, обитавших в условиях хронического загрязнения (станция 1) активность NADPH-диафоразы в ЦНС и уровень метаболитов нитратов и нитритов в гемолимфе выше, чем у животных с контрольной станции 2. В мозге и брюшном ганглии контрольных крабов распределение NADPH-d/NO не отличалось от интактных особей и не изменялось на протяжении всего эксперимента.

Болевое воздействие вызывает повышение NO-ергической активности в мозге и брюшном ганглии и концентрации метаболитов NO (нитрат/нитрит-ионов) в гемолимфе крабов обеих групп (Рис. 1), вне зависимости от условий их обитания.

В течение первых 5-10 мин после инъекции изменения затрагивают нервные структуры, расположенные на стороне повреждения – экспрессия фермента сначала регистрируется в брюшном ганглии в нейропилях первой пары конечностей, а затем в мозге - в нейропилях ольфакторных долей, в латеральных антеннулярных нейропилях, антеннальных нейропилях и в тегументарном нейропиле. На контралатеральной стороне мозга интенсивность гистохимической реакции остается на уровне контроля.

Через 10 мин наблюдалась экспрессия NADPH-d в нервных волокнах и единичных нейронах в грудном ганглии и в латеральных группах нейронов в подглоточном ганглии. В мозге в этот период в тритоцеребруме в группе 17 маркируются 2 нейрона грушевидной формы диаметром 40-45 мкм. Через 30 мин после повреждения в грудном ганглии регистрируется активация NADPH-d за счет экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в сегментарных мотонейронах и интернейронах медиальных и латеральных групп преимущественно на стороне

повреждения. Однако, несмотря на заметные гистохимические изменения, результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что экспрессия фермента в этот период выражена незначительно. Одновременно в мозге выявлялась NADPH-d активность в ранее негативных нейронах: в одиночном нейроне в группе 16 на стороне повреждения и в 1-2 крупных нейрона в группе 11, которые также активно маркировались антителами к индуцибельной NO-синтазе (iNOS). В протоцеребруме в этот период маркировались единичные NADPH-d-позитивные нейроны в группе 6.

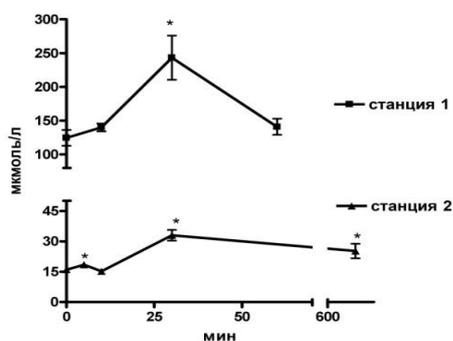


Рис. 1. Динамика содержания метаболитов оксида азота в гемолимфе прибрежных крабов. По оси абсцисс – длительность повреждающего воздействия, по оси ординат – концентрация нитратов\нитритов. Звездочкой отмечены достоверные изменения содержания нитрат\нитрит-ионов по сравнению с контрольными величинами, $p \leq 0.05$.

Через 40-60 минут изменения, регистрируемые в грудном ганглии на стороне повреждения распространяются на нейронные структуры противоположной стороны, а также затрагивают нижележащие нейроны и абдоминальный ганглий. У животных, обитающих в загрязненных районах, на фоне стресс-индуцированной активации NADPH-диафоразы наблюдается также экспрессия iNOS в протоцеребруме. Как свидетельствуют результаты иммуноблотинга, на 60 мин происходит максимальная экспрессия iNOS в ЦНС (Рис. 2).

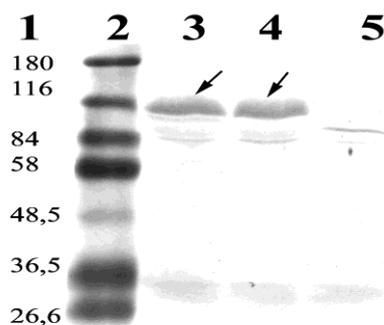


Рис. 2. Выявление индуцибельной NO-синтазы методом иммуноблотинга в гомогенатах мозга краба. 1, 2 – преокрашенные стандарты молекулярный весов, кДа; 3 – через 30 мин; 4 – через 60 мин после введения формалина; 5 – контрольная группа. Стрелками указан белок, специфически связывающий антитела к индуцибельной NO-синтазе.

В ходе исследования установлено, что первоначально болевое воздействие вызывает изменения в структурах связанных с модуляцией клешневых рефлексов: в нейропиях конечностей, в интер- и мотонейронах сегментарных ганглиев. Именно эти структуры проявляют максимальную NADPH-d-активность сразу после болевого воздействия и в них регистрируется экспрессия iNOS в более отдаленный период. Наличие высокой активности NADPH-d- в сегментарных и интерсегментарных мотонейронах и интернейронах, значительная часть которых у ракообразных является поливалентными, позволяет этим нейронам интегрировать информацию от большого количества разнородных чувствительных элементов, обеспечивая многообразие поведенческих форм в изменяющейся окружающей среде.

Болевое воздействие также активирует NO-ергические системы мозга, это позволяет предположить, что модулирующее влияние оксида азота при ноцицептивных реакциях осуществляться не только на сегментарном уровне, но и в интегративных центрах, расположенных в различных отделах надглоточного ганглия. Наиболее значимые количественные изменения NO-ергической активности регистрировались в структурах, связанных с восприятием механосенсорных и проприоцептивных сигналов – в нейропилях ольфакторных долей, латеральных антенна 1 и антенна 2 нейропилей. Кроме того, обнаружено увеличение NADPH-d/NOS активности в нейронах протоцеребрума, которые в обычных условиях фермент не синтезируют. Этот отдел мозга у ракообразных играет важную роль в интегративных процессах ЦНС, формировании двигательных программ поведения, механизмах контроля, регуляции активности моторных центров при экстремальных ситуациях (Shirinyan et al., 2006). Не исключено, что избыточная продукция iNOS в нейронах протоцеребрума провоцирует нейротоксические эффекты, ограничивающие адаптивные возможности животных. Механизмы, обеспечивающие активацию NO-ергической системы в центральных ганглиях, могут быть связаны также с системой восходящих интернейронов, которые организуют ростральную трансмиссию проприо- и экстероцептивных сигналов у ракообразных и обеспечивают механизмы интерсегментарной координации рефлексов (Nagayama, Sato, 1993).

Параметры поведенческой реакции животных на введение препаратов значительно различались как среди крабов из отдельных экспериментальных групп, так и у животных, отловленных на станциях 1 и 2. Через 3-5 секунд после инъекции у животных контрольной и экспериментальной групп наблюдалось резкое торможение общей активности – животные застывали на месте, прижимая к корпусу поврежденную конечность. В дальнейшем у экспериментальных крабов происходило резкое изменение двигательного поведения: в течение всего периода наблюдения они были гиперактивными, совершали много движений сгибания, разгибания и встряхивания поврежденными клешневыми конечностями. Аналогичная двигательная реакция у контрольных животных регистрировалась лишь в первые 2-3 минуты после инъекции, а в последующем их поведение не отличалось от интактных животных.

В экспериментальной группе крабов, отловленных на станции 2, в первую минуту после инъекции формалина в 80% случаев происходила самоампутация поврежденной конечности. У крабов станции 1, аутоотомия клешневой конечности после введения формалина наблюдалось только у 10% животных. Кроме того, крабы, станции 2, демонстрировали большую жизнеспособность; в течение 3.5-4 часов после инъекции формалина среди них было обнаружено около 10% погибших животных. За этот же период наблюдения в выборке ракообразных, отловленных в загрязненном районе станции 1, погибали до 60% животных. Таким образом, влияние острого травматического воздействия на животных, испытывающих хронический стресс, приводит к срыву адаптации и запускает ряд несовместимых с жизнью нейрохимических перестроек.

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют предполагать важное значение NO-ергической системы крабов при адаптации к действию факторов внешней среды. У животных, обитающих на контрольной станции, изменение активности системы NO сопутствует формированию защитной поведенческой стратегии при развитии острой стресс-реакции. В условиях хронического загрязнения стресс-протективное действие системы синтеза NO реализуется лишь при воздействии одиночного стресс-фактора, а при комбинированном влиянии стресс-факторов может приводить к срыву адаптации и гибели животных.

Работа поддержана грантом ДВО 12-04-01436-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Nagayama T., Isogai Y., Sato M. et al. Intersegmental ascending interneurons controlling uropod movements of the crayfish *Procambarus clarkii* // *J Comp Neurol*. 1993. V 332(2). P. 155-174.
2. Okuda K., Sakurada C., Takahashia M. et al. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats// *Pain*. 2001. V. 15. P. 107-115.
3. Shirinyan, D., Teshiba, T., Taylor, K. et al. Rostral ganglia are required for induction but not expression of crayfish escape reflex habituation: Role of higher centers in reprogramming low-level circuits // *Journal of Neurophysiology*, 2006. V. 95(4). P. 2721-2724.

NITRIC OXIDE SYSTEM IN THE PAIN REACTIONS OF SHORE CRABS LIVING DIFFERENT ECOLOGICAL CONDITIONS

Lamash N.E., Kotsyuba E.P., Dyuzen I.V.

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the FEB RAS, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

E-mail: ninalamash@yandex.ru

We was studied the system of NO synthesis in the brain and hemolymph of the shore crabs *Hemigrapsus sanguineus* which inhabited in the different ecological conditions as well as under a strain and without the latter. It was established higher level of NO in the tissues of the intact crabs which inhabited in the regions with higher anthropogenic load in comparison with the animals from environmentally safe regions. The essential distinctions were found in the crab's behavior and in the level of NO systems biochemical activity after acute damaging exposure. There was dramatic increase of the number of NO-positive elements in the brain and the level of NO metabolites in hemolymph all groups of crabs immediately after injuries. In one hour after exposure the expression of inducible form NOS in the protocerebrum neurons of crabs which habited in the regions with anthropogenic pollution was detected. The present results for the first time demonstrated the influence of pollutions on the activity of NO-dependent processes and indicated to the NO involvement in the formation of the defense behavioral reactions of crustaceans under acute stress exposure.

ИЗУЧЕНИЕ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ *BATRACHIUM KAUFFMANNII* В ОНТОГЕНЕЗЕ

Лебедева О.А.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

e-mail: anya@ibiw.yaroslavl.ru

Высшие водные растения являются неотъемлемым компонентом практически всех ботанико-географических областей и играют важную роль в функционировании гидроэкосистем. Однако, до сих пор, остаются недостаточно изученными вопросы о путях адаптации гидрофитов к существованию в разных средах обитания (водной и наземной) в связи с динамикой уровня воды и выявлении амплитуды изменчивости их жизненной формы.

Batrachium kauffmannii (Clerc) V. Krecz. (шелковник Кауфмана) – водное, полностью погруженное растение с тонкими побегами (≤ 50.0 см), удлинёнными междуузлиями (≤ 10.0 см), листьями (7.0 – 10.0 см), многократно рассечёнными до черешка на волосовидные нежные сегменты, спадающие вне воды в кисть. Цветки крупные (1.0 см), на длинных цветоносах (≤ 8.0 см). Данный вид встречается в быстро текущих реках, ручьях с холодной водой и каменистым грунтом, формируя плотные, различные по площади заросли (Лисицина, Папченков, 2009).

Каждый вегетационный сезон (в период летней межени), часть зарослей растений оказывается в обсыхающей зоне прибрежья. И если для земноводных растений таких, как: *Callitriche palustris*, *Elatine hidropiper* и др., способных пройти свой жизненный цикл как по типу истинно-водных, так и наземных растений, существование в подобных условиях – обычное явление, то для гидрофитов – это стрессовые условия, требующие выработки комплекса приспособлений для выживания (Лапиров, 2003). Исследования показали, что *B. kauffmannii*, обладая широкой амплитудой адаптационных возможностей по отношению к среде обитания и развитой способностью к гидроморфозу, способен непродолжительное время существовать в наземных условиях, формируя вегетативные органы с нехарактерной анатомо-морфологической структурой и приобретая черты, присущие для растений других экологических групп (ЭГ).

Экологически вынужденное формирование наземной формы у *B. kauffmannii* может происходить в любом периоде онтогенеза, на базе укореняющегося осевого (материнского) побега и фрагментов побегов ветвления n – порядка, образующихся в результате морфологической дезинтеграции (МД) (Смирнова и др. 1976), присущей большинству водных растений. Установлено, что строение исходных побегов отличается рядом биолого-морфологических особенностей: характером роста, структурой побега, продолжительностью и

степенью развития, однако в любом случае, пазушные почки дают новые побеги следующего порядка в дальнейшем неспособные к ветвлению. Естественное полегание растений сопровождается придаточным укоренением по всей длине побега, за исключением одного – двух верхних метамеров, сохраняющих ортотропное положение. Через 7 – 10 суток формируются наземные особи, имеющие частичную морфологическую связь за счет отмершей части исходного (материнского) побега, но уже не связанных физиологически. В результате дальнейшего развития образуется клон, состоящий из приземистых, низкорослых растений. Часто исследователи ошибочно принимают такие особи за семенные проростки.

Временно переходя в наземно – воздушную среду обитания, растения демонстрируют ряд уникальных структурно-функциональных адаптаций, позволяющих приспособиться к новым условиям. Наиболее показательным является изменение строения образующегося наземного побега, формирующего укороченные почти до розетки (0.3 см) междоузлия и обнаруживающего большое сходство со структурой побега водной формы шелковника в ювенильном возрастном состоянии. На этом этапе онтогенеза у *B. kauffmannii* непродолжительное время сохраняется розеточный характер роста побега, поскольку « ... на ранних, крайне важных для выживания периоде, образующиеся ассимиляты расходуются прежде всего, на создание ассимиляционной поверхности и, в меньшей степени, на формирование стебля как вспомогательной структуры » (Марков, 1992). Совершенство адаптивных возможностей у *B. kauffmannii* проявляется в изменении морфотипа листа. Тонкие, нитевидные сегменты листа водной формы высыхают за несколько минут, скручиваясь в неоппадающие образования, уменьшая тем самым испарение влаги и сохраняя живыми клетки меристемы. Вновь появляющиеся ассимилирующие листья шелковника отличаются от дефинитивных сокращением количества сегментов (с 12 до 3 соответственно) и глубиной их рассечения. Размеры листьев наземной формы достигают всего 1.0 – 1.5 см, исчезает характерная для шелковников нитевидность, сегменты становятся заметно более широкими и плоскими. В редких случаях побег наземной формы становится генеративным (если на исходном фрагменте изначально был заложен цветonos) и формирует один цветок, достигающий 0.8 см в диаметре. Семян, как правило, не образуется. Происходящие морфологические изменения и сокращение всех без исключения морфометрических параметров вегетативных органов у наземной формы, демонстрируют, безусловно, регрессивное развитие растения. Но зная причину, вызывающую вышеописанные специфические модификации, их можно рассматривать как адаптивную реакцию *B. kauffmannii* к изменению экологических условий, позволяющую виду не только выжить, но и успешно продолжать свое развитие в новой среде обитания.

ВЫВОДЫ

- Нестабильность уровня воды для биологически пластичного *B. kauffmannii* является одним из определяющих факторов, оказывающих существенное влияние как на морфобиологические особенности этого растения, так и на его онтогенез.
- Перейти к наземному образу и в такой форме пережить неблагоприятный период, шелковнику Кауфмана позволяет широкий спектр адаптаций (способность к поливариантности морфоструктуры побега, высокий уровень лабильности развития вегетативных органов), при которых он сохраняет способность к осуществлению жизненных функций на фоне меняющихся внешних условий.
- Преобразования затрагивают как структуру, так и функцию побега шелковника, что, в конечном итоге находит отражение в жизненной форме и в сокращении жизненного цикла растения. В воде развивается по типу поликарпика, летне-осеннезеленого малолетника вегетативного происхождения, а на суше, при обсыхании побережья – как однолетник монокарпик.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лапиров А.Г. Экологические группы растений водоемов // Гидрботаника: методология, методы: Матер. Школы по гидрботанике (Борок, 8 – 12 апреля 2003 г.) Рыбинск: ОАО «Рыбинский дом печати», 2003. С. 5 – 22.

2. Лисицина Л.И., Папченков В.Г., Артеменко В.И. Флора водоемов Волжского бассейна / Определитель сосудистых растений. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 219 с.
3. Марков М.В. Структура и популяционная биология малолетних растений центра Русской равнины. Автореф. Дисс ... докт. биол. наук. М.: 1992. 35 с.
4. Смирнова О.В., Заугольнова Л.Б., Торопова Н.А., Фаликов Л.Д. Критерии выделения возрастных состояний и особенности хода онтогенеза у растений различных биоморф /ценопопуляции растений (Основные понятия и структура). М., 1976. С. 14 – 43.

**THE STUDY OF THE ADAPTIVE ABILITIES
OF *BATRACHIUM KAUFFMANNII* IN ONTOGENESIS.**

O.A. Lebedeva.

Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok, Russia
e-mail: anya@ibiw.yaroslavl.ru

On the example of *Batrachium kauffmannii* the ways of adaption to the existence of hydrophytes in different habitats (aquatic and terrestrial) are studied.

**ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН У *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER ПРИ
ДЕЙСТВИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ**

А.И. Луцив, О.И. Боднар

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка,
Тернополь, Украина, e-mail: hiazunt@mail.ru

Токсикотолерантность водорослей, как и большинства гидробионтов, во многом определяется эффективностью функционирования их метаболических систем, осуществляющих детоксикацию и выведение токсического вещества, а также адаптивными перестройками в организме, компенсирующими неблагоприятное воздействие (Гандзюра, 2008; Schmid, 2002). Этот разнообразный и многоступенчатый процесс требует значительных затрат энергии клетки.

Учитывая разнообразие субстратов, из которых может быть извлечена энергия, в условиях биотехнологического культивирования водорослей важно как поддержание энергетического статуса клеток, так и нерасходование клеткой в энергетических целях тех субстратов, которые могут быть использованы как биотехнологически-ценные вещества. Поскольку в энергогенерировании принимает участие большое количество ферментов, важно установить активность тех из них, которые связаны с синтезом, прежде всего липидов, в связи с потенциальным использованием последних как компонентов «водорослевого биотоплива»: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), глицерол-3-фосфат ацилтрансферазы (Г-3-ФАТ) и ключевого фермента электронно-транспортной цепи – цитохромоксидазы (ЦО) (Schmid, 2002). Относительно роли биосинтеза липидов у водорослей в обеспечении восстановительных субстратов для ЦО, следует отметить, что скорость образования доноров электронно-транспортной цепи определяется не только интенсивностью обмена, но и особенностями цитозольно-митохондриального соотношения окислительно-восстановительных процессов, на которые существенно могут влиять ионы металлов. Поэтому чрезмерное количество металлов может влиять как на отдельные ферменты энергетического обмена, так и в целом на окислительно-восстановительный баланс в клетке, а также накопление и метаболизм липидов (Костюк, 2011).

Целью данного исследования было изучение активности ферментов энергетического обмена у одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. при действия ионов металлов (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}).

Исследовали одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer., которую выращивали в условиях накопительной культуры в люменостате при освещении лампами дневного света (2500 лк) и температуре $20 \pm 1^\circ C$ на питательной среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горхема (№11) (Методы, 1975). В экспериментах к культуре добавляли водные растворы солей – $MnSO_4$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ и $Pb(NO_3)_2$ из расчета на

ион: Mn^{2+} – 0,2 мг/дм³; Zn^{2+} – 1,0 мг/дм³; Cu^{2+} – 0,002 мг/дм³; Pb^{2+} – 0,1 мг/дм³ (Давыдова, 2002). В качестве контроля использовали клетки, выращенные в среде без металлов. Период инкубации водорослей с веществами составил 3 и 7 сут.

Для изучения активности ферментов приготавливали гомогенаты клеток в культуральной среде, которые затем центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 15 мин. при температуре +4°C. Полученную таким образом суспензию использовали для дальнейших экспериментальных работ.

Активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.8) определяли по скорости восстановления НАДФ⁺ и НАД⁺, которое регистрировали спектрофотометрически на СФ-46 (Тоубо, 1999.). Активность цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1.) определяли по методу Штраус (Straus, 1954.). Активность глицерол-3-фосфат ацилтрансферазы (КФ 2.3.1.15) оценивали по включению 49,1 МКи ¹⁴С-олеата в течении 1 ч. суспензией клеток хлореллы. Реакцию останавливали 10% трихлоруксусной кислотой, липиды экстрагировали реактивом Фолча и проводили измерение радиоактивности образцов на сцинтилляционном счетчике LS-100С «Beckman» (США) (Xu et al., 2009). Содержание белков определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Полученные результаты обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

Анализ результатов исследования показал (рис. 1), что при действии на хлореллу ионов исследованных металлов активность Г-6-ФДГ имеет тенденцию к уменьшению в течение всего периода экспозиции: Zn^{2+} – на 8% и 5%, Pb^{2+} – на 24% 28% на 3 и 7 сутки действия соответственно, Mn^{2+} (7 сутки) – на 19%, Cu^{2+} (3 сутки) – 54%. Активность фермента значительно возрастала на 3 сутки только в случае действия Mn^{2+} (на 213%).

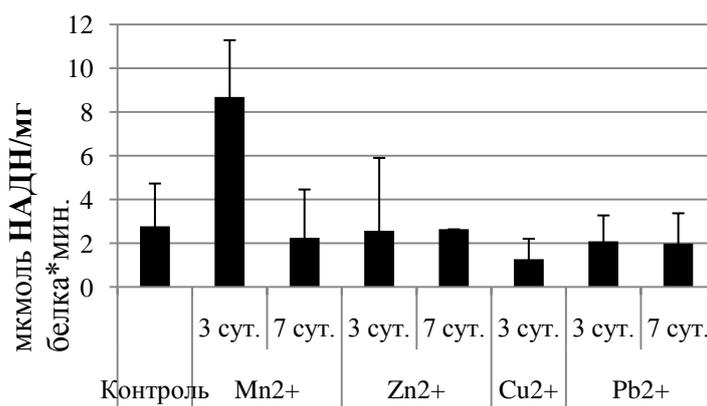


Рис. 1. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы *Ch. vulgaris* при действии ионов металлов

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – ключевой фермент пентозофосфатного пути превращения глюкозы, катализирует окисление глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконолактона. Образующийся при этом НАДФН+Н⁺ используется для биосинтеза липидов. Инактивация этого фермента свидетельствует о том, что источником восстановленных НАДФН+Н⁺ продукты превращения глюкозы для биосинтеза липидов не используются. Подавление активности Г-6-ФДГ при действии ионов металлов возможно за счет их связывания с SH-группами белков. Максимальное снижение активности данного фермента наблюдается при действии ионов Pb^{2+} и Cu^{2+} , что подтверждается высоким сродством ионов меди к тиоловым группам. Активирующий эффект ионов марганца может быть объяснен как его низким сродством к SH-группам, так и кофакторным участием в ряде ферментов углеводного обмена.

Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (рис. 2) возрастает при действии Zn^{2+} – на 209% и 10% на 3 и 7 сутки действия соответственно, Pb^{2+} – на 86% и 214%, а при действии Mn^{2+} – уменьшается на 95% и 82% на 3 и 7 сутки действия соответственно. При действии Cu^{2+} активность фермента уменьшается на 29% на 3 сутки и увеличивается – на 218% на 7 сутки действия.

Активации гликолиза способствуют ионы Zn^{2+} и Pb^{2+} , а Mn^{2+} и Cu^{2+} (3 сутки), наоборот, подавляют его, что подтверждается активацией или ингибированием промежуточной реакции процесса с участием глицерол-3-фосфатдегидрогеназы.

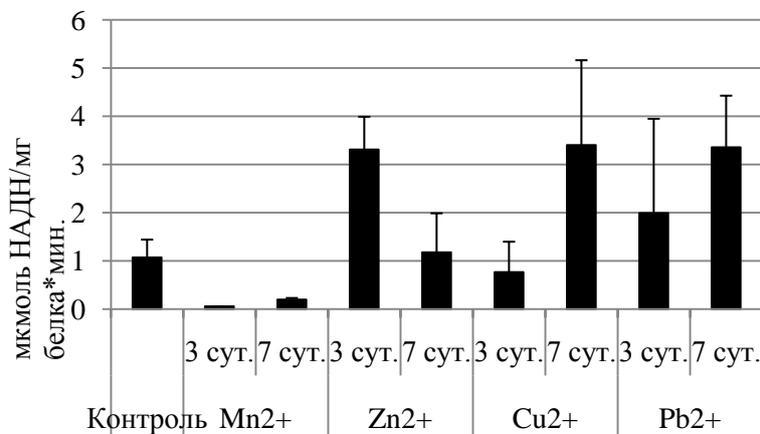


Рис. 2. Активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы *Ch. vulgaris* при действии ионов металлов

Активность глицерол-3-фосфатацилтрансферазы (рис. 3) при действии ионов исследованных металлов возрастает по сравнению с контрольными показателями: при действии Mn^{2+} – на 86% и 41%, при действии Zn^{2+} – на 48% и 82%, при действии Cu^{2+} – 77% и 53%, при действии Pb^{2+} – на 40% и 49% на 3 и 7 сутки соответственно.

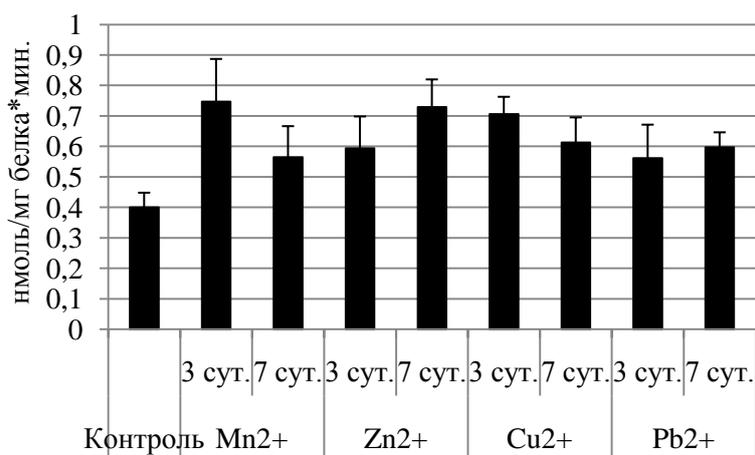


Рис. 3. Активность глицерол-3-фосфатацилтрансферазы *Ch. vulgaris* при действии ионов металлов

Увеличение активности глицерол-3-фосфатацилтрансферазы возможно связано с обеспечением энергией определенных стрессовых и адаптивных реакций, прежде всего, с увеличением содержания в клеточных мембранах отдельных (адаптивных) классов липидов (Костюк, 2011).

Возрастание активности цитохромоксидазы (рис. 4) наблюдается при действии всех исследованных ионов металлов: Mn^{2+} – на 33% и 115%; Zn^{2+} – 17% и 85%; Cu^{2+} – на 182% и 70%; Pb^{2+} – на 84% и 95% соответственно в течение 3 и 7 суток.

Цитохромоксидаза, как известно, играет ключевую роль в регуляции скорости окислительного фосфорилирования и причастна у гидробионтов к энергетическому обеспечению процессов проникновения, связывания и детоксикации ионов металлов (Хоменчук, 2003). У хлореллы это подтверждается на 3 сутки действия ионов металлов, поскольку возрастание активности фермента согласуется с токсичностью иона: $Zn^{2+} < Mn^{2+} < Pb^{2+} < Cu^{2+}$.

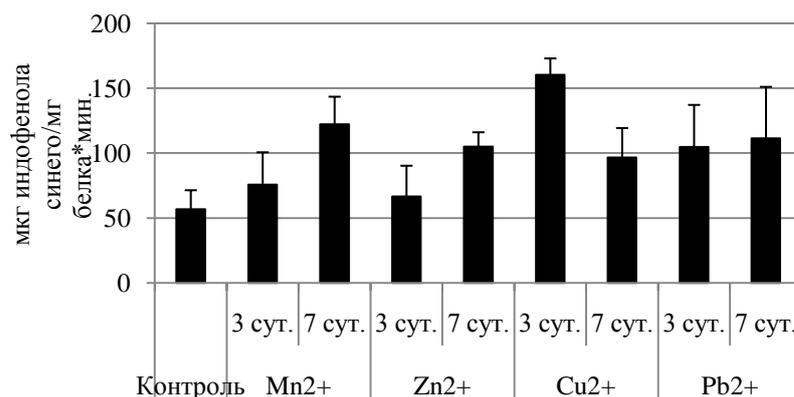


Рис. 4. Активность цитохромоксидазы *Ch. vulgaris* при действии ионов металлов

Таким образом, учитывая метаболическую взаимосвязь исследованных ферментов и последовательность использования ими продуктов предыдущей реакции в качестве субстратов следующей, установлено ингибирование ионами металлов активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, и как следствие, пентозофосфатного пути (особенно Pb²⁺ и Cu²⁺) и гликолиза (Mn²⁺ и Cu²⁺ (3 сутки)), что сопровождается снижением образования восстановленных никотинамидов и АТФ. Сопряженное функционирование глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и глицерол-3-фосфат ацилтрансферазы наблюдается при действии ионов Zn²⁺, Pb²⁺ в течение всего периода действия и Cu²⁺ на 7 сутки действия. При действии ионов исследованных металлов активация синтеза липидов из глицерол-3-фосфата, вероятно, происходит не только за счет окисления глюкозы, но и других энергетических субстратов (например, аминокислот и т.п.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гандзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкочочинності в екології. – Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В. Гнатюка, 2008. 144 с.
2. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века. М., 2002. 140 с.
3. Костюк Е.В. Структурно-функциональная реакция клеток водных растений на действие токсикантов: автореф. дис... канд. биол. наук. К., 2011. 25с.
4. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Ред. А.В. Топачевский. Киев: Наук. думка, 1975. 247с.
5. Хоменчук В.А. Биохимические особенности проникновения и распределения некоторых тяжелых металлов в организме карпа чешуйчатого: автореф. дис... канд. биол. наук. Львов, 2003. 23с.
6. Xu J., Zheng Z., Zou J. A membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Thalassiosira pseudonana* regulates acyl composition of glycerolipids // Botany. 2009. Vol. 87, № 6. P. 544–551.
7. Lowry O. H., Rosenbroug N. I., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
8. Schmid K.M., Ohlroge J.B. Lipid metabolism in plants / Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam: Elsevier, 2002 P. 93–126.
9. Straus W. Colometric microdetermination of cytochrome c oxidase // J. Biol. Chem. 1954. Vol. 207, № 2. P. 733.
10. Toyobo enzymes (Diagnostic Reagent Grade) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; Glucose-6-phosphate dehydrogenase: [Электронный ресурс]. 1999. Режим доступа: http://www.toyobo-global.com/seihin/xr/enzyme/e_top.html. Проверено 24.04.2012.

ENERGETIC METABOLISM IN *CHLORELLA VULGARIS* BEIJER FOR THE ACTIONS OF IONS OF METALS

A.I. Lutsiv, O.I. Bodnar

Investigated the activation or inhibition of the activity of enzymes of energetic metabolism, including glucose-6-phosphatedehydrogenase (EC 1.1.1.49), glycerol-3-phosphatedehydrogenase (EC 1.1.1.8), glycerol-3-phosphate acyltransferase (EC 2.3.1.15), cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1), in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* Beijer. for the actions of ions of metals (Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺).

ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ КАРПА (*CYPRINUS CARPIO L.*)

Б.З. Ляврин, В.А Хоменчук, В.З. Курант

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, г.
Тернополь, Украина

E-mail: bohdan.lyavrin@gmail.com

Исследование состава и обмена липидов, выполняющих в живых организмах различные функции, выявило их значительную экологическую вариабельность у представителей разных видов. Значительный интерес представляет изучение различных аспектов липидного обмена у рыб, поскольку эта группа низших позвоночных животных выделяется видовым разнообразием и условиями проживания, имеет, в отличие от млекопитающих, ряд особенностей в физиолого-биохимических адаптациях на уровни липидов (Грициняк, 2010; Moffat, 2006). Одна из отличительных особенностей метаболизма липидов рыб заключается в значительной амплитуде состава и интенсивности накопления липидов, которое наступает как в результате эндогенных изменений, так и под влиянием условий внешней среды и отчетливо проявляется в годовом цикле. В ходе годового цикла возможно перераспределение липидных запасов между тканями и органами, изменение интенсивности, порядка расходования и накопления липидов в зависимости от доминирующих в этот период процессов метаболизма (Ржановская, 1980; De Witt, 1963).

Эколого-физиологические особенности липидного статуса рыб связаны, прежде всего, с годовыми и жизненными циклами, возрастной изменчивостью, половыми особенностями и адаптациями к различным факторам; зависят от соотношения липолиза и липогенеза и в значительной степени определяются системой транспорта липидов (Елисеева, 1985).

Исходя из вышеизложенного, представлялось интересным исследование особенностей липидного обмена пресноводных рыб, а именно карпа, являющегося ценным промысловым видом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на двухлетках карпа (*Cyprinus caprio L.*) массой 250 – 300 г. Рыб отбирали из реки Серет, которая протекает на территории Тернопольской области. Воды этой реки, в основном, используются для хозяйственно-бытовых нужд. Водоснабжение коммунального хозяйства, как правило, строится на возвратной основе. В пределах этих территорий формируются определенные объемы сточных вод и мусора, что негативно влияет на состояние малых рек. Учитывая аграрную направленность региона, наибольшее влияние на режим малых рек осуществляет сельскохозяйственная деятельность. Ее главным проявлением, определяющим состояние малых рек, являются: изменение естественной структуры растительного покрова речных долин. Применение минеральных удобрений на полях и огородах обуславливает поступление в реки большого количества соединений азота и фосфора, использование пестицидов, что может способствовать миграциям ядохимикатов по пищевым цепям и их накоплению в организмах конечных потребителей, включая рыб и человека.

Для исследования рыб отбирали из водоемов непосредственно перед экспериментом путем тралового отлова промышленным способом. После этого их транспортировали в лабораторию, где сразу ткани брали для исследований.

Навески тканей печени и жабр измельчали на холоде в гомогенизаторе. После этого ткани помещали в мерные колбы объемом 25 мл. с притертой пробкой, куда наливали свежеприготовленную смесь хлороформа и метанола (2:1) в отношении одна часть ткани до двадцати частей экстрагирующей смеси. Содержимое колбы оставляли на 12 часов для экстракции. Фильтровали через складчатый бумажный фильтр. Для полноты экстракции липидов остаток ткани на фильтре обрабатывают дополнительно 5 мл. смеси хлороформ-метанола (2:1).

Для удаления нелипидных водорастворимых примесей, экстрагируемых хлороформ-метанольной смесью, липидный экстракт промывали 1% раствором КСІ. При этом, водорастворимые примеси диффундируют в воду (Орел, 2007). В системе ясно различаются три фазы: верхняя – водно-метанольная (прозрачная), нижняя – хлороформная (мутная), а на границе между ними – более или менее плотная, в зависимости от исследуемой ткани, белая пленка, содержащая липиды.

Отделение водно-метанольной фазы осуществляли с помощью водоструйной помпы. Следует отметить, что небольшая часть липидов теряется с водно-метанольной фракцией.

После отделения водно-метанольной фазы раствор количественно переносили в предварительно взвешенный на аналитических весах сухой и чистый бюкс, в котором высушивали липидный экстракт на водяной бане. После повторного взвешивания бюкса с осадком липидов определяли массу этого осадка. Содержание липидов рассчитывали в мкг/г массы исследованной ткани (Кейтс, 1975).

Разделение липидов на отдельные фракции производили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии в герметических камерах на пластинках "Silufol UV-154" (Копытов, 1983), перед работой пластинки активировали 30 минут при температуре 105⁰С в сушильном шкафу. Полученный хлороформный раствор пробы липидов сначала упаривали досуха, а потом растворяли в 1 мл хлороформа. Полученные пробы липидов наносили на пластинку микродозатором в количестве 25мкл, и медленно помещали их в хроматографические камеры. Разделение общей фракции липидов проводили смесью растворителей гексан–диэтиловый эфир–ледяная уксусная кислота в соотношении 70:30:1. Подвижной фазой для разделения фракций фосфолипидов была смесь хлороформ–метанол–ледяная уксусная кислота–дистиллированная вода в соотношении 60:30:7:3. Полученные хроматограммы проявляли в камере, насыщенной парами йода, для идентификации отдельных фракций липидов использовали специфические реагенты и очищенные стандарты (Кейтс, 1975).

Количество фосфолипидов определяли по методу Васьковского (Vaskovsky, 1985). Минерализацию фосфолипидов проводили при температуре 180⁰С, при добавлении концентрированной хлорной кислоты. Оптическую плотность фосфора определяли спектрофотометрическим методом (Орел, 2007).

Все полученные данные обработаны статистически (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что характер распределения липидов в тканях и органах зависит от условий среды, двигательной активности, возраста и т.д. В нашей работе мы наблюдаем, что количество липидов в жабрах карпа ниже по сравнению с печенью: 21,5мкг/г и 9мкг/г липидов в ткани печени и жабр, соответственно, что является типичным для представителей этого вида. Значительная трофическая пластичность и быстрое приспособление в кормовом рационе позволяют карпу в значительной степени накапливать липиды в печени, которые могут быть использованы как для энергетических, так и для пластических нужд (Сидоров, 1983). Как видно из полученных результатов, содержание липидов в неспецифических тканях, таких как жабры, не высоко; необходимое для метаболизма количество липидов поступает сюда с помощью системы переносчиков.

Наряду с общим содержанием липидов, мы исследовали и их фракционный состав. Нами были выделены следующие фракции: триацилглицеролы (ТАГ), незатерифицированные жирные карбоновые кислоты (НЭЖК), диацилглицеролы (ДАГ), свободный холестерол (ХЛ), моноацилглицеролы (МАГ) и фосфолипиды (ФЛ). Исследуемый фракционный состав фосфолипидов следующий: лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилинозитол (ФИ), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилетаноламин (ФЕА).

Важно отметить, что наряду с явным различием в общем количестве липидов в тканях, их фракционный состав остается примерно одинаковым (Рис. 1).

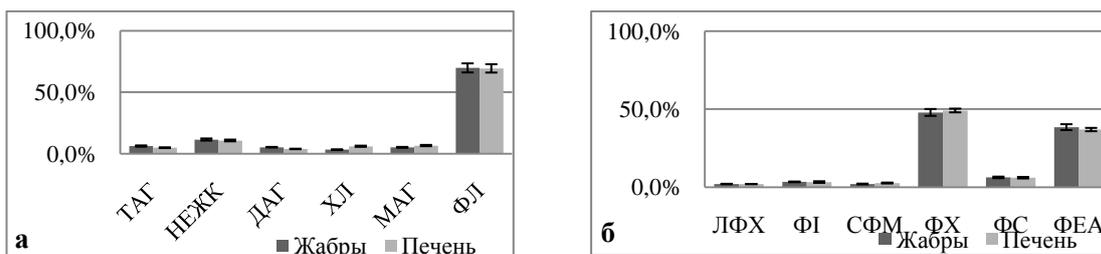


Рис.1 Содержание фракций (а) нейтральных липидов и (б) полярных липидов в тканях карпа.

Содержание триацилглицеролов (ТАГ) можно связать с количеством фосфолипидов в мембранах исследованных тканей. Из литературных данных известно, что триацилглицеролы являются формой запасных липидов, используемых для синтеза фосфолипидов (ФЛ), а также для обеспечения энергетических потребностей (Мецлер Д., 1990). ТАГ участвуют и в стабилизации мембран при токсическом действии, поскольку увеличение их содержания соотносится с уплотнением и уменьшением текучести мембран. Под стрессовым воздействием на мембраны активируются липазы и фосфолипиды, поэтому наряду с ростом уровня ТАГ наблюдается увеличение содержания в мембранах диацилглицеролов (ДАГ) и неэтерифицированных жирных карбоновых кислот (НЭЖК) (Ржановская Ф.М., 1980).

Анализируя данные показатели содержания отдельных классов липидов, можно сказать следующее: низкое содержание предшественников синтеза триацилглицеролов и самих ТАГ в тканях исследуемых организмов характерен для рыб данной экологической группы. Неактивный образ жизни их не требует значительных затрат энергии. Основным источником которой являются нейтральные липиды – триацилглицеролы. Концентрация данных классов в тканях жабр и печени карпа говорит об активных процессах липолиза, или как альтернативный вариант метаболизма – использование моноацилглицеролов (МАГ) в энергетическом обмене.

Моно- и диацилглицеролы являются промежуточными продуктами метаболизма триацилглицеролов. Поэтому их содержание меняется обратно пропорционально к изменению содержания триацилглицеролов.

Изменение общего содержания неэтерифицированных жирных карбоновых кислот, как предшественников синтеза липидов, так и продуктов их распада в тканях рыб, является одним из критериев оценки направления липидного метаболизма: низкое их количество является свидетельством активизации синтеза липидов, а увеличение – липолиза.

Известно, что свободный холестерол (ХЛ) наряду с фосфолипидами влияет на проницаемость мембран, обеспечивает их ультраструктуру и функциональную активность, текучесть биомембран, обеспечивает активность многих мембраносвязанных ферментов и систем пассивного транспорта, а также механическую плотность бислоя мембран. Количество холестерина, как правило, соответствует степени разреженности клеточных липидов и их избирательной проницаемости, снижением катионной проницаемости мембраны, ингибированием большинства липолитических ферментов (Брокерхоф Г., 1978).

Фосфолипиды, как типичные структурные липиды, образуют высокоупорядоченный белково-липидный матрикс мембран, определяют их свойства и функции. Имеются в литературе данные об интенсификации синтеза фосфолипидов, как своеобразной защиты клеток организма от проникновения через их мембрану токсикантов, путем ее уплотнения.

Высокая концентрация фосфолипидов на фоне существенно низшего количества свободного холестерина указывает на активные процессы образования мембранных структур, основными составляющими которых являются фосфолипиды – фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЕА).

Наряду с выполнением определенной специфической функции, каждый фосфолипид принимает участие в выполнении общих мембранных функций клеток, о чем свидетельствует их различная локализация в субклеточных фракциях. Изменения фосфолипидного состава, безусловно, влияют на физико-химическую структуру мембран, на их функциональные свойства, такие как проницаемость, вязкость, подвижность элементов липидно-белковой мембраны, ее стабильность, энзиматические свойства мембранных ферментов.

Известно, что фосфатидилэтаноламин является предшественником в синтезе фосфатидилхолина в реакции метилирования (Мецлер Д., 1990). Поэтому можно говорить о высокой активности процесса образования ФХ в гепатоцитах и клетках жабр исследованных рыб.

При сравнении количественных характеристик фракций фосфолипидов в тканях печени и жабр не выявлено существенных различий. Это указывает на постоянство фосфолипидного состава, необходимого для обеспечения оптимальной физико-химической структуры мембран, и, как результат, – оптимальных функциональных свойств, таких как проницаемость, вязкость, подвижность элементов липидно-белковой мембраны, ее стабильность и т.д.

В общем, полученные нами результаты указывают на характерное распределение фракций нейтральных и фосфолипидов в исследуемых тканях карпа. Такие показатели

характерны для видов этой экологической группы и указывают на пластическое направление метаболизма липидов в клетках печени и жабр исследуемых рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Брокерхоф Г. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978. 426с.
2. Грициняк І.І. Обмін ліпідів у риби. Львів: Тріада плюс. 2010. 338с.
3. Елисеева Е.И. Сезонная динамика липидного обмена ставриды *Trachurus symmetricus* // Рыб. хоз-во. 1985., № 6. С. 35-38.
4. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.
5. Копытов Ю.П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов // Экология моря. 1983., №.12. С.76-80.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов. 4-е. изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
7. Мецлер Д. Биохимия: Химические реакции в живой клетке. М.: Мир, 1990. Т.2. 608с.
8. Орел Н.М. Биохимия липидов. Минск, 2007. 37с.
9. Ржановская Ф.М. Состав и свойства липидов гидробионтов // Использование биологических ресурсов Мирового океана. М.: Наука, 1980., С.189–211.
10. Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240с.
11. De Witt K.W. Seasonal variations in cod liver oil. // J. Sei. Fd. Agric. 1963., V.14. P.92–18.
12. Lipid metabolism and health / [edited by R.G. Moffat, B. Stamford]. Taylor and Francis, 2006. 377p.
13. Vaskovsky V.E., Kastetsky E.V., Vasedin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. 1985., Vol. 114. P. 129-141.

FEATURES OF LIPID COMPOSITION OF CERTAIN TISSUES OF CARP

B.Z. Lyavrin, V.A. Khomenchuk, V.Z. Kurant

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

We have studied specific of lipid composition of hepatocytes and cells of gills in carp, fractional value and physiological significance of certain classes of polar and nonpolar lipids of examined tissues. It is important to note that along with the obvious differences in the total number of lipids in the tissues, their fractional composition remains approximately the same.

Overall, our results indicate a characteristic distribution of phospholipids and neutral fractions in the studied tissues of carp. These figures are typical for types of such environmental group and pointing to plastic direction of lipids metabolism in cells of the liver and gills of studied fish.

ДИНАМИКА КАТИОНОВ В ПЕЧЕНИ И ГОНАДАХ САМОК ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* (L.) В ПЕРИОД ВИТЕЛЛОГЕНЕЗА

А.С. Маврин, В.И. Мартемьянов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

e-mail: mavr_as@mail.ru

Непрерывность существования различных видов зависит как от внешних факторов, так и внутренних, связанных с воспроизводительной способностью организмов. Развитие репродуктивной системы рыб начинается на ранних этапах развития и завершается наступлением половой зрелости. На основе изучения годового цикла изменения яичников костистых рыб В.А. Мейеном (1939) была разработана шестиступенчатая шкала зрелости яичников. Им было установлено, что продолжительность второй стадии зрелости яичника, когда ооциты находятся в фазе однослойного фолликула, может сильно варьировать (Мейен, 1944). Эта стадия может быть очень кратковременной, а у некоторых видов длится несколько лет. Поэтому особи одного вида в разных экологических условиях могут созревать в разном возрасте, при разной длине и массе. Переход из второй стадии зрелости яичников в третью характеризуется большим (трофоплазматическим) ростом ооцитов. В это время ооциты проходят фазу вакуолизации цитоплазмы, а в печени начинается образование предшественника яичного желтка – белка вителлогенина, который транспортируется кровью в плазму половых клеток. Наряду с аминокислотами, липидами, углеводами, в синтезе вителлогенина важную

роль играют минеральные вещества. Процессы синтеза и транспорта вителлогенина происходят при участии кальция (Follet, et al., 1968).

Ионы натрия, калия, кальция, магния наряду с другими неорганическими элементами необходимы для развития, роста, полового созревания и осуществления физиолого-биохимических процессов в организме гидробионтов. Насчитывается около 200 ферментативных реакций, активаторами или ингибиторами которых являются электролиты (Чернавина, 1970; Романенко, 1978). Известно (Bygrave, 1967), что ионы кальция, магния и калия контролируют активность ферментов гликолитического пути. Ионы кальция ингибируют, а магния и калия активируют гликолиз. Ионы калия участвуют также в процессе синтеза белка. При низком содержании ионов калия замедляется работа белок-синтезирующей системы (Спирин, Гаврилова, 1971). При участии ионов кальция в гонадах происходит фосфорилирование протеинов (Behra, Gall, 1991).

Поскольку электролиты обуславливают физиолого-биохимические реакции в печени и гонадах в процессе образования желтка, то для понимания механизма формирования половых продуктов необходимо знать, как в ходе вителлогенеза изменяется содержание ионов в тканях этих двух органов.

Целью настоящей работы было определение содержания кальция, магния, натрия, калия в печени и яичнике самок плотвы *Rutilus rutilus* (L.) в ходе вителлогенеза.

Материалом для работы послужили самки плотвы, пойманные в р. Суножка (Некоузский район Ярославской области) крючковой снастью в летне-осенний период со 2 июля по 24 ноября 2009 года. У каждой особи измеряли длину и массу тела. Определяли стадию зрелости гонад по шестибальной шкале (Мейен, 1939; Сакун, Буцкая, 1968). Всего было исследовано 49 самок. Определение катионов в печени и гонадах проводили методом пламенной спектрофотометрии. Для этого брали навески ткани печени и гонад. Озоление и определение содержания ионов в пробах проводили по ранее описанной методике (Мартемьянов, 1992). Концентрацию катионов в тканях выражали в ммоль/кг сырой массы (СМ). Статистическая и графическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ Microsoft Office Excel 2003, Statistica 6.0. Связь между содержанием катионов в тканях определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R_s). Результаты представлены в виде средних и их ошибок. Оценка достоверности проведена для уровня вероятности $P=0.05$ по U-критерию Манна-Уитни.

Было установлено, что зрелость гонад самок плотвы соответствовала в июле – II, августе – II-III, сентябре – III, октябре – III-IV, ноябре – IV стадии зрелости. Статистически значимых различий в длине и массе рыб между изученными выборками рыб не установлено. Это имеет значение, поскольку ранее (Таликина, Халько, 1993) было показано, что уровень функциональной зрелости половой железы в значительной мере связан с размерно-массовыми характеристиками рыб. Средняя длина и масса исследованных самок плотвы составляла 138.6 ± 6.2 мм и 56.8 ± 9.0 г соответственно.

В ходе полового цикла во II стадии зрелости яичников осуществляется процесс мейоза, который завершается при переходе гонад к стадии II-III. В этот и дальнейший периоды до завершения IV стадии зрелости происходит процесс накопления желтка в яйцеклетках. В начальный период вителлогенеза в печени происходит усиление синтетической функции, связанной с образованием белка вителлогенина. В синтезе белка участвуют различные ферменты, активность которых зависит от содержания ионов кальция, магния, натрия и калия. Полученные данные показывают (рис.), что у самок плотвы концентрация катионов в печени и гонадах изменялась, указывая на их участие в формировании половых продуктов.

Между содержанием Ca и Mg наблюдалась обратная статистически значимая коррелятивная связь $R_s = -0.563$. Концентрация кальция в печени при переходе яичников самок плотвы от II стадии зрелости к II-III уменьшилась в 6.1 раза. Низкая концентрация кальция в печени сохранялась у самок в последующий период вителлогенеза вплоть до перехода гонад в IV стадию зрелости. Известно, что ионы кальция ингибируют ферментативные реакции (Bygrave, 1967). Следовательно, снижение концентрации Ca в печени указывает на снятие ингибирующего эффекта на активность ферментов.

В ходе вителлогенеза концентрация магния в печени самок увеличивалась от 6.4 ± 0.8 (II стадия) до 13.3 ± 0.3 ммоль/кг СМ (IV стадия). Увеличение содержания магния в печени происходило плавно при переходе яичников из II стадии зрелости в II-III, и резко при переходе

из III в III-IV стадию. Это может свидетельствовать об усилении активности магний зависимых ферментов в печени и соответственно накоплении желтка в ооцитах.

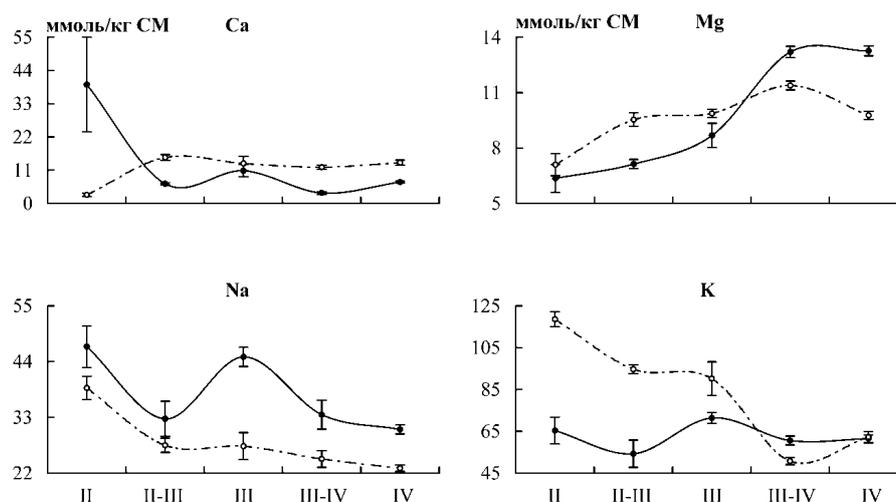


Рис. Динамика катионов в печени и гонадах самок плотвы в периоды малого и большого роста ооцитов. По оси абсцисс – стадии зрелости гонад; по оси ординат - содержание катионов, ммоль/кг сырой массы; пунктирная линия - гонады; сплошная линия – печень.

За период наблюдений, изменение концентраций Na и K в печени шло синхронно, что подтверждается расчетами коэффициента ранговой корреляции Спирмена $R_s=0.612$. В процессе перехода гонад из II в II-III стадию зрелости концентрация натрия и калия в печени снижалась, а при увеличении размеров ооцитов к III стадии – повышалась. Быстрое накопление в ооцитах желтка и увеличение концентрации калия в печени свидетельствуют об ускорении работы белок-синтезирующей системы (Спирин, Гаврилова, 1971). В дальнейшем, при переходе яичников из III в IV стадию зрелости содержание натрия и калия в печени снижалось.

В ходе вителлогенеза из печени кровью в гонады доставляется белок вителлогенин, который служит основой для синтеза яичного желтка. В отличие от печени, в гонадах происходило увеличение концентрации кальция в 5.4 раза при переходе яичников из стадии II в II-III стадию зрелости. Ранее (Мартемьянов, 1998) было показано аналогичное увеличение концентрации кальция в гонадах самок плотвы Рыбинского водохранилища в нагульный период в июле-августе. В последующий период кальций в гонадах оставался на высоком уровне 12.9 ± 1.3 ммоль/кг СМ. Завершение формирования желтка из белка предшественника происходит в гонадах рыб. Как показали исследования на радужной форели (Behra, Gall, 1991), роль кальция заключается в стимулировании фосфорилирования многочисленных протеинов в клетках гонад.

Увеличение концентрации магния в гонадах указывает на повышение активности различных ферментов, в том числе участвующих в синтезе яичного желтка. Нарастание концентрации магния в яичниках происходило до достижения гонадами III-IV стадии зрелости. В последующий период наблюдалось уменьшение содержания магния, свидетельствующее о снижении синтетической активности ферментов, и замедлении образования яичного желтка. Между содержанием магния в гонадах и печени самок плотвы установлена положительная статистически значимая коррелятивная связь $R_s=0.623$.

В переходный период из II в II-III стадию зрелости яичников происходило резкое снижение содержания Na в гонадах, оставаясь впоследствии на одном уровне до IV стадии зрелости гонад.

Для деления клеток требуется калий (Takagi et al., 1986). Очевидно, что высокий уровень калия 118.6 ± 3.6 ммоль/кг СМ в гонадах II стадии зрелости перед началом вителлогенеза необходим для деления половых клеток. В период формирования половых продуктов от II к IV

стадии зрелости наблюдалось уменьшение концентрации калия в гонадах. Это может указывать на отсутствие деления клеток и снижение синтеза белка в яичнике.

Таким образом, в процессе вителлогенеза существенно изменяется содержание катионов в печени и гонадах самок плотвы, влияя на активность разных ферментов, в том числе участвующих в созревании половых продуктов. В ходе вителлогенеза содержание кальция в печени снижалось, а магния увеличивалось, указывая на усиление синтетических процессов в этом органе. В гонадах основную активационную функцию в преобразовании вителлогенина в желток, очевидно, играют ионы магния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Мартемьянов В.И. Содержание катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани рыб Волжского плеса Рыбинского водохранилища.// Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1992. №28(5). С.576–581.
2. Мартемьянов В.И. Сезонная динамика содержания кальция в плазме, эритроцитах, мышцах и гонадах плотвы *Rutilus rutilus* L.// Биология внутренних вод. 1998. №2. С.73-79.
3. Мейен В.А. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб.// Изв.АН СССР. Серия биол. 1939. №3. С.389-420.
4. Мейен В.А. Изменения полового цикла самок костистых рыб под влиянием экологических условий.// Изв.АН СССР. Отдел. биол. наук. 1944. №2. С.65-77.
5. Романенко В.Д. Печень и регуляция межклеточного обмена. Киев: Наукова Думка, 1978. 184с.
6. Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб. Мурманск.: Главрыбвод, 1968. 47с.
7. Спирин А.С., Гаврилова Л.П. Рибосома.- М.: Наука, 1971. 254с.
8. Халько В.В., Таликина М.Г. Сравнительная характеристика преднерестового состояния гонад репродуктивных изолятов фитофильных рыб Рыбинского водохранилища.// Вопросы ихтиологии. 1993. Т.33. №2. С.241-247.
9. Чернавина И.А. Физиология и биохимия микроэлементов.- М.: Высшая школа, 1970. 310с.
10. Behra R., Gall R. Calcium/calmodulin – dependent phosphorylation and the effect of cadmium in cultured fish cells.// Comp. Biochem. Physiol. C. 1991. V.100. №1-2. P.191-195.
11. Bygrave F.L. The ionic environment and metabolic control.// Nature. 1967. V.214. № 5089. P.667-671.
12. Follet B. K., Nicholls T. J., Redshaw M. R. The vitellogenic response in the South African clawed toad (*Xenopus laevis* Daudin).// Journal of Cellular Physiology. 1968. №72. P.91–102.
13. Takagi K., Okabe Y., Yoshimura K., Ichikawa Y. Changes in intracellular K⁺ and Na⁺ ion concentrations during cell growth and differentiation.// Cell. Struct. Funct. 1986. V.11. № 3. P.235-243.

DYNAMICS OF CATIONS IN THE LIVER AND GONADS OF FEMALES OF ROACH *RUTILUS RUTILUS* (L.) DURING OF VITELLOGENEZIS

A.S. Mavrin and V.I. Martemyanov

Papanin Institute for Biology of Inland Waters, RAS, 152742 Borok, Yaroslavl region, Russia

During vitellogenesis there are essential changes of the content of cations in liver and gonads of females of roach, influencing on activity of different ferments, including reproductive products participating in ripening.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ, СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ ФРАКЦИЙ ВОДЫ В ОРГАНИЗМЕ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

Мартемьянов В.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

п. Борок, Ярославская область, Россия, e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru

Вода представляет собой важнейший компонент, как животных, так и растений. Она является универсальным биологическим растворителем, той средой, в которой совершаются обменные процессы организма. Кроме этого вода непосредственно воздействует на формирование и стабилизацию структуры макромолекул и различных более сложных

надмолекулярных образований (Аксенов, 1990). Показано непосредственное участие молекул воды в метаболических процессах клеток органов и тканей организма (Вартапетян, 1970).

Установлено, что вода в биологических жидкостях образует три различные фракции. Вся вода того или иного биологического образца представляет собой общую концентрацию. Часть воды связана с веществами в виде гидратной оболочки и считается осмотически неактивной. Разность между общей и связанной водой составляет фракцию свободной воды, которая является растворителем для осмотически активных веществ.

Общую концентрацию воды определяют калориметрическим методом посредством высушивания проб тканей при температурах от 100°C и выше. Данный метод дает сходные результаты, поэтому является общепризнанным и не подвергается какой-либо критике.

Фракцию связанной воды выявляют методом *in vitro*, помещая эритроциты или пробы каких-либо тканей в растворы разной осмотической концентрации. Образцы ведут себя как осмометр, проявляя линейную зависимость изменения их объема или содержания воды в определенном диапазоне осмотической концентрации раствора (рис. 1). Аппроксимация прямой линии на ось абсцисс отражает в точке пересечения значение объема или содержания связанной (осмотически неактивной) воды. Полученные таким способом результаты для какого-либо вида ткани существенно различаются между собой. Например, по данным разных авторов (LeFevre, 1964; Bobo, 1967; Bogner et al., 1998; Fullerton et al., 2006) содержание связанной воды в эритроцитах человека составляет от 1 до 61.5%. По разности концентраций между общей и связанной рассчитывают долю свободной воды. Поскольку получаемые значения связанной воды существенно колеблются, то и разность (доля свободной воды) также сильно различается между собой для какой-либо ткани. Из-за этого невозможно производить расчет содержания того или иного элемента или общую концентрацию всех веществ на фракцию свободной воды (растворителя), значения которой представляют нестабильную величину.

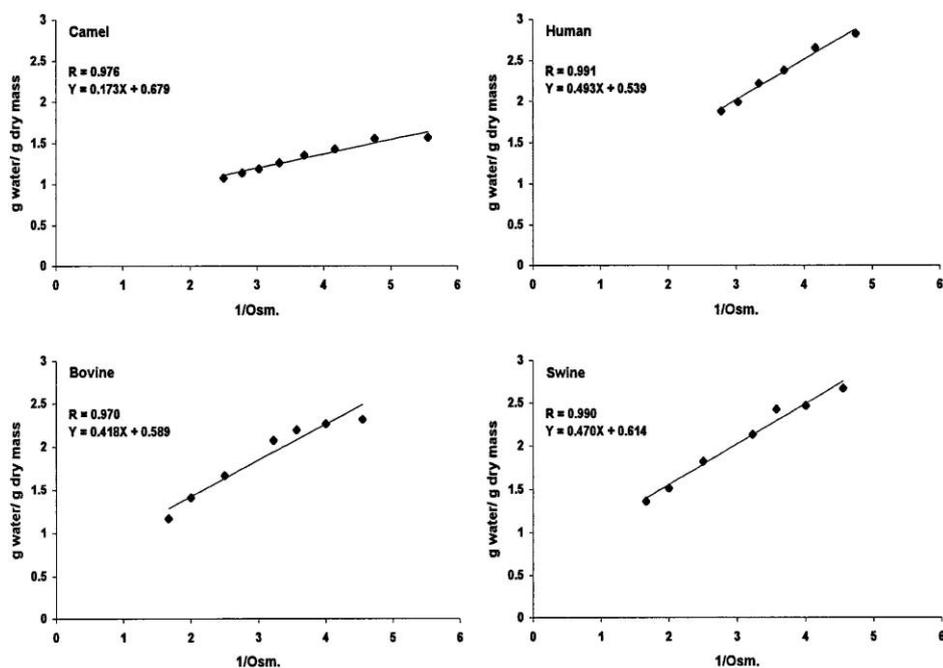


Рис. 1. Изменение содержания воды в эритроцитах верблюда, человека, быка и свиньи *in vitro* в зависимости от осмотической концентрации раствора маннита (Bogner et al., 1998).

Поэтому, на практике при изучении осмотических процессов, связанных с регуляцией клеточного объема, перемещения растворенных веществ и воды через клеточные мембраны и ряда других фундаментальных свойств живых организмов, основываются на общей концентрации воды в биологических жидкостях. При этом предполагается, что внутренняя среда и внутриклеточные жидкости организма животных находятся в осмотическом равновесии.

Таким образом, наблюдается явное противоречие. С одной стороны, экспериментальные данные показывают, что часть воды в биологических жидкостях связана веществами и не

является активной. С другой стороны, это не учитывается в исследованиях, а исходят из положения, что вся вода в биологических объектах как бы является растворителем.

Прямого стандартного метода, который давал бы сопоставимые результаты по определению свободной и связанной фракции воды, не разработано. Эмпирически найдено, что пробы различных тканей организма, высушенные при температуре выше 100°C, находясь вне сушильного шкафа на воздухе, впитывают определенное количество влаги. Встает вопрос: отражает ли эта поглощенная тканью влага фракцию связанной воды? Чтобы ответить на этот вопрос, нами были проведены специальные исследования по определению различных фракций воды в плазме, эритроцитах и мышцах ряда видов пресноводных рыб Рыбинского водохранилища.

Пробы плазмы, эритроцитов и мышц, предназначенные для определения воды, помещали в сушильный шкаф и нагревали его до 105°C. В пробах оценивали три различные фракции воды: общую (суммарную), связанную и свободную. Общую концентрацию воды выявляли следующим образом. В крыше термостата имеются отверстия для контактного и обычного термометра. Обычный термометр мы удаляли, создавая воздушный обмен между камерой шкафа и средой комнаты. При температуре 105°C, вся вода проб переходила в парообразное состояние и горячим потоком воздуха удалялась через отверстие наружу. (В случае герметичной камеры при закрытом отверстии внутри нее образовывалось парообразное облако воды). Когда сухие пробы достигали постоянного веса, их по одной штуке извлекали из сушильного шкафа и очень быстро взвешивали в «горячем» состоянии. Разность между сырой массой пробы и ее «горячим» сухим остатком оценивалась как общая фракция воды.

Находясь при комнатной температуре, сухие пробы обводнялись до постоянного веса за счет связывания строго определенного количества воды. Эту часть воды оценивали как связанная вода. Разность между общей и связанной водой представляет свободную фракцию воды. Все фракции воды выражали в %, по отношению ко всей массе пробы.

Общее количество солей в пробах (в пересчете на NaCl) определяли кондуктометрическим методом с использованием платиновых электродов и реохордного моста Р-38, как это предложено В.В. Хлебовичем (1974), показавшим линейную зависимость возникающего между электродами сопротивления от степени разбавления раствора. Затем общую концентрацию электролитов в плазме, эритроцитах и мышцах рассчитывали в миллиосмоль на 1л раствора или 1 кг сырой массы ткани (осмолярность), а так же в миллиосмоль на 1 кг общей и свободной H₂O (осмоляльность).

Полученные данные показывают, что по содержанию воды жидкости внутренней среды (плазма) и тканей организма (эритроциты) отличаются между собой (табл.). При этом в плазме доля общей и свободной фракции воды больше, а связанной меньше по отношению к внутриклеточной жидкости эритроцитов. В мышечной ткани леца различные фракции воды имели следующие значения: общая 80.6±0.19%, свободная 78.9±0.22%, связанная 1.78±0.06%. Видно, что доля связанной воды в различных тканях организма является небольшой по отношению к общей концентрации.

Таблица. Содержание различных фракций воды (%) в плазме и эритроцитах пресноводных рыб.

| Виды | n | Плазма | | | Эритроциты | | |
|---------|---|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| | | Общая | Свободная | Связанная | Общая | Свободная | Связанная |
| Лещ | 7 | 93.5±0.13 | 92.7±0.14 | 0.73±0.05 | 76.2±0.35 | 74.2±0.32 | 1.93±0.09 |
| Гибриды | 6 | 94.0±0.33 | 92.3±0.54 | 1.61±0.53 | 76.1±0.78 | 71.1±0.93 | 3.76±0.59 |
| Плотва | 9 | 92.6±0.23 | 90.4±0.27 | 2.23±0.33 | 76.0±0.53 | 71.3±0.98 | 4.66±0.67 |
| Язь | 6 | 93.4±0.43 | 91.2±0.67 | 2.21±0.65 | 76.6±0.22 | 71.9±0.90 | 3.90±0.66 |
| Густера | 1 | 91.9 | 89.3 | 1.51 | 75.7 | 70.5 | 5.2 |
| Уклея | 7 | 90.4±0.27 | 88.9±0.29 | 1.51±0.36 | 75.0±0.41 | 70.8±0.62 | 3.58±0.24 |
| Щука | 4 | 94.4±0.04 | 93.8±0.10 | 0.59±0.08 | 75.8±0.36 | 73.1±0.42 | 2.74±0.22 |
| Судак | 1 | 90.6 | 89.1 | 1.53 | 81.6 | 79.5 | 2.1 |
| Окунь | 8 | 91.6±0.29 | 90.5±0.43 | 1.08±0.17 | 81.7±0.88 | 79.8±0.94 | 1.83±0.11 |

Ряд исследователей (это принято и в термодинамике) выражают концентрации веществ на определенный объем или массу растворителя (моляльность). Однако, биологи, чаще всего концентрации рассчитывают на определенный объем раствора (молярность) или массу ткани.

Различные способы расчета приводят к разным противоположным друг другу результатам при рассмотрении взаимосвязей осмотических концентраций во внутренней среде и тканях организма.

Расчет общей осмотической концентрации на массу плазмы, эритроцитов и мышц показывает, что жидкость тканей гипоосмотична по отношению к окружающей их внутренней среде (рис. 2). При такой ситуации происходило бы обезвоживание тканей, приводя к их сморщиванию. Ясно, что такой расчет не отражает реальную ситуацию.

При расчете осмотической концентрации на массу (объем) общего количества воды, эритроциты оказываются гиперосмотическими, а мышцы остаются, хотя и в меньшей степени, гипоосмотическими по отношению к окружающей их жидкости.

Постулируется, что растворителем осмотически активных веществ в биологических жидкостях является фракция свободной воды. Расчет осмотической концентрации на массу (объем) свободной воды показывает, что эритроциты на определенную величину являются гиперосмотическими, по отношению к окружающей их жидкости. Перепад осмотических концентраций способствует перемещению определенного количества воды в эритроциты, создавая гидростатическое давление, которое увеличивает объем красных кровяных клеток. Такое состояние имеет адаптивное значение. Во-первых, чем больше объем эритроцита, тем больше молекул кислорода может поместиться в нем, увеличивая тем самым кислород-несущую емкость. Во-вторых, состояние эритроцитов в осмотическом равновесии с плазмой крови является неустойчивым. В таком случае, любые небольшие колебания осмотической концентрации плазмы крови будут сопровождаться изменением объема эритроцитов и как следствие, сдвигами кислород-несущей емкости. В гиперосмотическом состоянии, объем эритроцитов в определенной степени не зависит от колебаний осмотической концентрации плазмы крови.

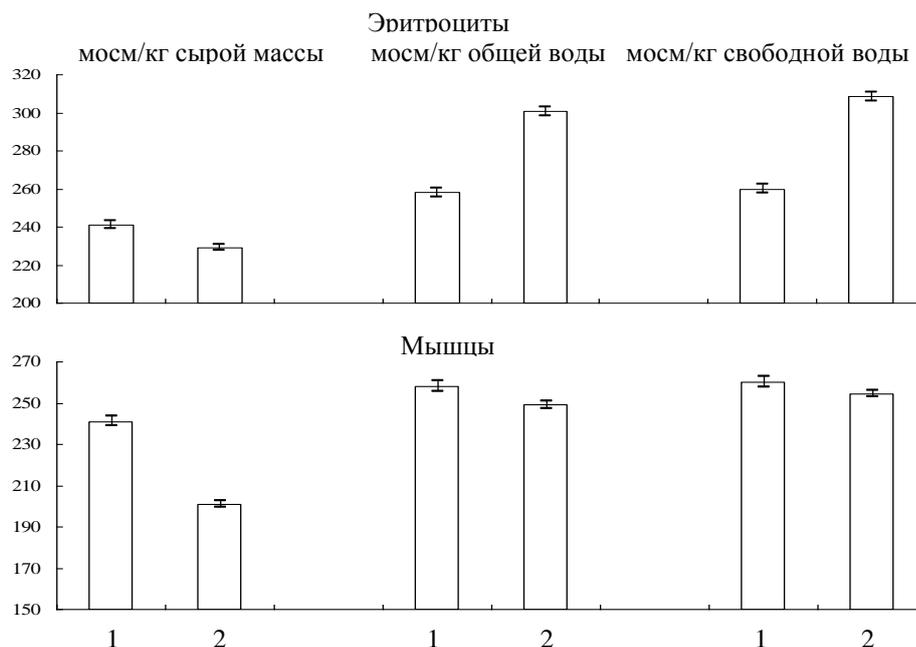


Рис. 2. Осмотические концентрации плазмы (1) и тканей (2) леща при разных способах расчета.

Содержание электролитов в плазме крови и мышечной ткани леща, рассчитанное на количество свободной воды, не различалось между собой. При таком расчете мышечная ткань оказывается изоосмотичной с окружающей жидкостью (рис. 2). Это состояние свидетельствует об адекватности предлагаемого прямого способа определения фракций воды в тканях организма животных. При этом результаты согласуются с положением о том, что свободная вода является той фракцией, где растворены осмотически активные вещества.

ВЫВОДЫ

1. Высушивание организма и проб различных тканей животных и растений при 101-105°C до постоянного веса и быстрое взвешивание каждого отдельного образца в «горячем» состоянии (индивидуальной пробы, взятой из нагретого до 101-105°C термостата) позволяет определять общее количество воды посредством оценки разности между сырой массой и сухим «горячим» остатком. Высушенные пробы, находясь вне нагретого термостата, постепенно впитывают в себя из атмосферы воду, достигая со временем постоянного веса. Количество воды впитанной пробой представляет связанную воду. Она определяется как разность между увлажненным и «горячим» сухим остатком. Разность между содержанием общей воды и связанной фракцией составляет свободную воду.

2. В зависимости от способа расчета, осмотическая концентрация имеет разные значения и соотношения между плазмой, эритроцитами и мышечной тканью организма. Адекватным способом является расчет осмотической концентрации на количество свободной воды, являющейся растворителем. При таком расчете эритроциты гиперосмотичны, а мышечная ткань изоосмотична внутренней среде организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. М.: Наука, 1990. 117 с.
2. Вартапетян Б.Б. Молекулярный кислород и вода в метаболизме клетки. М: Наука, 1970. 229 с.
3. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 1974. 235 с.
4. Bobo C.M.G. Nonsolvent water in human erythrocytes and hemoglobin solution // J. Gen. Physiol. 1964. V. 50. P. 2547-2564.
5. Bogner P., Csutora P., Cameron I.L., Wheatley D.N., Miseta A. Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // Biophys. J. 1998. V. 75. P. 3085-3091.
6. Fullerton G.D., Kanal K.M., Cameron I.L. On the osmotically unresponsive water compartment in cells // Cell. Biology International. 2006. V. 30. P. 74-77.
7. LeFevre P.G. The osmotically functional water content of the human erythrocyte // J. Gen. Physiol. 1964. V. 47. P. 585-603.

METHOD OF DEFINITION OF THE GENERAL, FREE AND CONNECTED FRACTIONS OF WATER IN THE ORGANISM AND TISSUES OF ANIMALS AND PLANTS

Martemyanov V.I.

The adequate method of definition of the general, free and connected fraction of water in an organism and tissues of animals and plants is proved.

МЕХАНИЗМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ ПОСТОЯННЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Мартемьянов В.И.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Ярославская область, Россия, e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru*

Обмен многих веществ между организмом водных животных и средой осуществляется через жабры. Они имеют обширную поверхность, позволяя растворенному в воде кислороду легко проникать в кровь. Однако такая структура жабр имеет негативные последствия для водно-солевого обмена. Содержание ионов во внутренней среде пресноводных гидробионтов существенно выше, чем в пресной воде (табл. 1).

В силу этого обстоятельства между организмом и внешней средой создаются ионные градиенты, обуславливающие с определенной скоростью диффузию электролитов из внутренней среды через поверхность жабр в пресную воду. Часть ионов теряется из организма с мочой.

Таблица 1. Содержание катионов во внутренней среде пресноводных гидробионтов и речной воде в природных условиях.

| Показатель | Внутренняя среда, ммоль/л | Речная вода | Градиент внутренняя/внешняя среда |
|--|---------------------------|-------------|-----------------------------------|
| Речной рак <i>Astacus astacus</i> L. (Мартемьянов, Маврин, 2010) | | | |
| Натрий | 178.0±2.5 | 0.66 | 270 |
| Калий | 7.1±0.5 | 0.09 | 79 |
| Кальций | 17.3±0.7 | 1.90 | 9 |
| Магний | 3.0±0.1 | 0.47 | 6 |
| Плотва <i>Rutilus rutilus</i> L. (Martemyanov, Mavrin, 2012) | | | |
| Натрий | 131.8±1.5 | 0.30 | 439 |
| Калий | 2.9±0.20 | 0.06 | 48 |
| Кальций | 3.5±0.22 | 1.80 | 2 |
| Магний | 1.1±0.06 | 0.50 | 2 |

Поскольку общая концентрация веществ внутри пресноводных гидробионтов существенно выше, чем в пресной воде, то эта ситуация образует осмотический градиент между организмом и внешней средой (табл. 2). В силу этого обстоятельства, вода из внешней среды по осмотическому градиенту устремляется через однослойный высокопроницаемый дыхательный эпителий в кровь, создавая водную нагрузку на организм (стремление к увеличению объема крови и разжижению ее компонентов).

Таблица 2. Общая концентрация (мосм/л) растворенных веществ во внутренней среде рыб (C_1) и в пресной воде (C_2).

| Вид | Общая концентрация | | $C_1 - C_2$ | Ссылка |
|-----------------|--------------------|----------------|-------------|-----------------------|
| | Плазма (C_1) | Вода (C_2) | | |
| Карп | 268.7 | 11.6 | 257.1 | Hegab, Hanke, 1982 |
| Веслонос | 221.6±2.5 | 3.0 | 218.6 | Краюшкина и др., 1996 |
| Радужная форель | 227.7±13.9 | 12 | 215.7 | Rao, 1969 |
| Змеёголов | 252.5±5.7 | 1 | 251.5 | Woo, Tong, 1982 |

Чтобы предотвратить обводнение организма, избыток воды выводится почкой, а потеря электролитов компенсируется за счет ионных насосов жаберного эпителия, которые осуществляют активный транспорт натрия, калия, кальция, магния, хлора из внешней среды в кровь, сопряженный с удалением из гидробионтов ионов аммония, водорода, бикарбоната. В результате согласованной работы почек и ионных насосов, объем воды и содержание ионов во внутренней среде и клеточной жидкости организма регулируются в толерантном диапазоне различных факторов среды при постоянных условиях в узких пределах, отражая норму реакции (рис. 1).

Диапазоны регуляции параметров гомеостаза для разных факторов перекрываются между собой у одного вида, но могут отличаться по амплитуде. Так зоны регуляции ионного гомеостаза карпа, полученные внутри толерантного интервала температуры (рис. 1а), шире таковых, зарегистрированных внутри таковой солености (рис. 1б). Возможно, это связано со стабильностью среды. Технические устройства не позволяли поддерживать температуру воды в аквариумах строго на одних значениях. В ходе опытов она колебалась в пределах 1-2°C, тогда как концентрация хлористого натрия в воде каждого аквариума была стабильной.

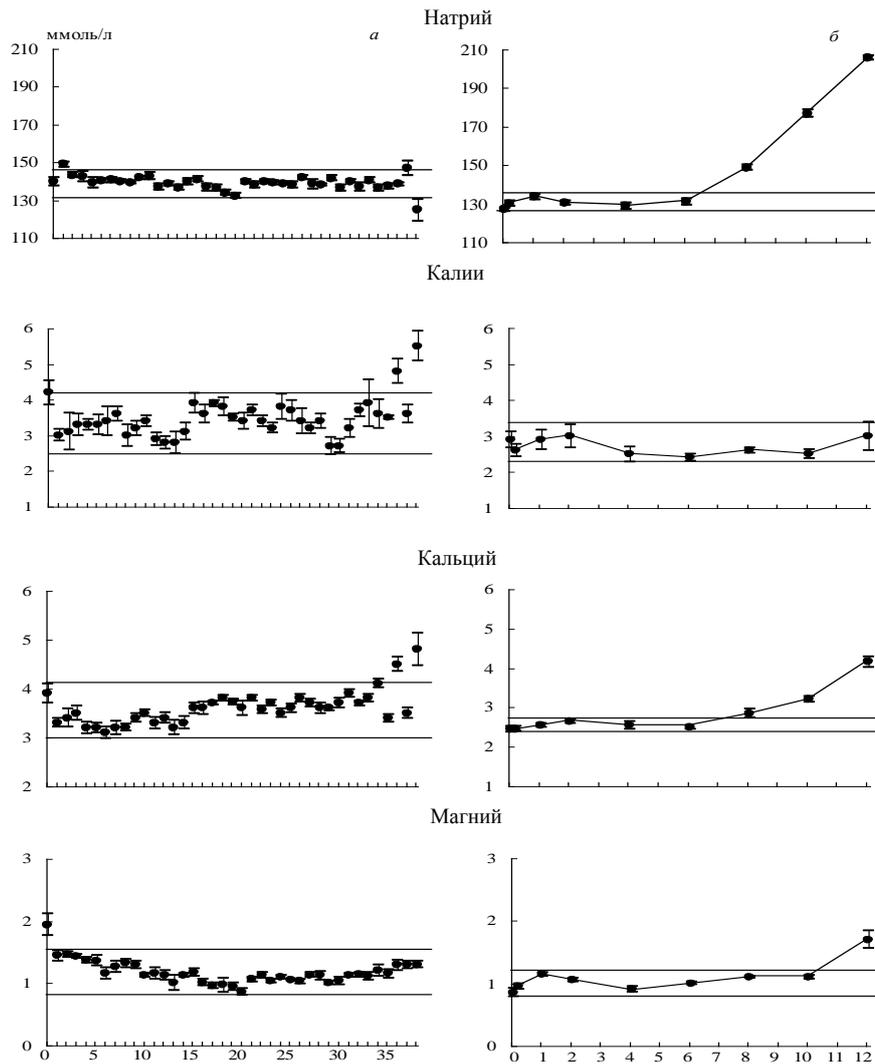


Рис. 1. Регуляция содержания катионов в плазме крови карпа, акклимированного к различным постоянным значениям температуры (*а*) и концентрации хлористого натрия (*б*) во внешней среде (По Мартемьянову, 1996). По оси абсцисс: *а* – температура акклимации, °С; *б* – содержание хлористого натрия во внешней среде, г/л. По оси ординат: концентрация катионов в плазме крови. Диапазоны регуляции ионов в плазме крови, отражающие норму реакции ограничены горизонтальными линиями относительно оси абсцисс.

Резкие изменения условий среды смещают ионный баланс в сторону преобладания выхода из организма главным образом одновалентных ионов, в результате чего содержание натрия и калия в течение первых 5 часов увеличивалось в воде экспериментальных емкостей (рис. 2, левый). В последующий период акклимации в лабораторных условиях, содержание этих ионов в воде стабилизировалось на определенных уровнях, свидетельствуя о достижении ионного баланса между организмом рыб и внешней средой.

Чистая скорость перераспределения ионов натрия и калия между организмом лещей и средой изменялась во времени в виде затухающего гармонического колебания (рис. 2, справа). Максимальные скорости потерь ионов наблюдались в первые 2 часа от начала воздействия, а затем незначительно колебались около нулевого значения (состояние баланса).

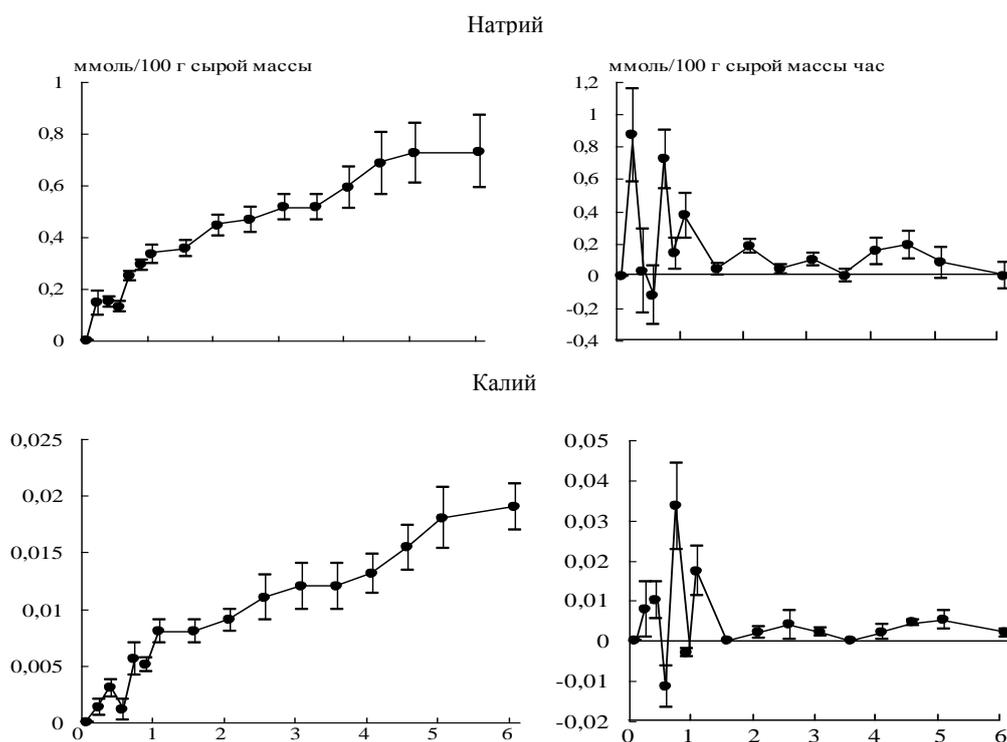


Рис. 2. Динамика содержания катионов в пресной воде и чистой скорости этого процесса в ответ на отлов, 30 мин транспортировку и в ходе акклимации 2х летних лещей к лабораторным условиям. По оси ординат - время, часы; по оси абсцисс: слева - изменение концентрации катионов в пресной воде экспериментальных емкостей с рыбами относительно исходного содержания; справа - чистая скорость обмена катионов между организмом и средой относительно баланса (нулевая линия).

Утечка ионов из организма гидробионтов в начальный период стресса приводит к существенному снижению осмотической концентрации внутренней среды главным образом за счет ионов натрия и хлора (рис. 3). В результате между внеклеточной и внутриклеточной жидкостью организма создается перепад осмотического давления, способствующий перемещению воды в клетки, вызывая их разбухание. При этом происходит не только перераспределение объемов между клеточной и внеклеточной жидкостями, но и возрастание суммарного содержания тканевой воды. Наиболее губительным для организма является обводнение мозга. Череп препятствует расширению этой ткани. Поэтому отек мозга при гипонатремии сопровождается ростом внутричерепного давления с целым рядом сопутствующих негативных последствий, включая высокую смертность.

Противодействие вредным процессам, обуславливаемых гипонатремией, осуществляется за счет ускорения функций натриевого насоса и K^+-Cl^- котранспорта, которые усиливают выход натрия, калия, хлора из клеток организма, приводя к снижению их уровней во внутриклеточных жидкостях (рис. 3). Так в первые сутки стресса концентрация натрия существенно уменьшилась, соответственно, в эритроцитах и мышцах плотвы на 64.7% и 42.6%, а калия на 16.3% и 43.6%, по отношению к исходным значениям. Выход ионов натрия, калия, хлора из клеток во внутреннюю среду организма противодействует развитию более суровой гипонатремии, гипоосмии и нарастанию осмотического перепада между внеклеточной и внутриклеточной жидкостями, препятствуя тем самым чрезмерной гидратации тканей. В ходе адаптации после воздействия происходит восстановление и стабилизация показателей гомеостаза на определенных уровнях (рис. 3).

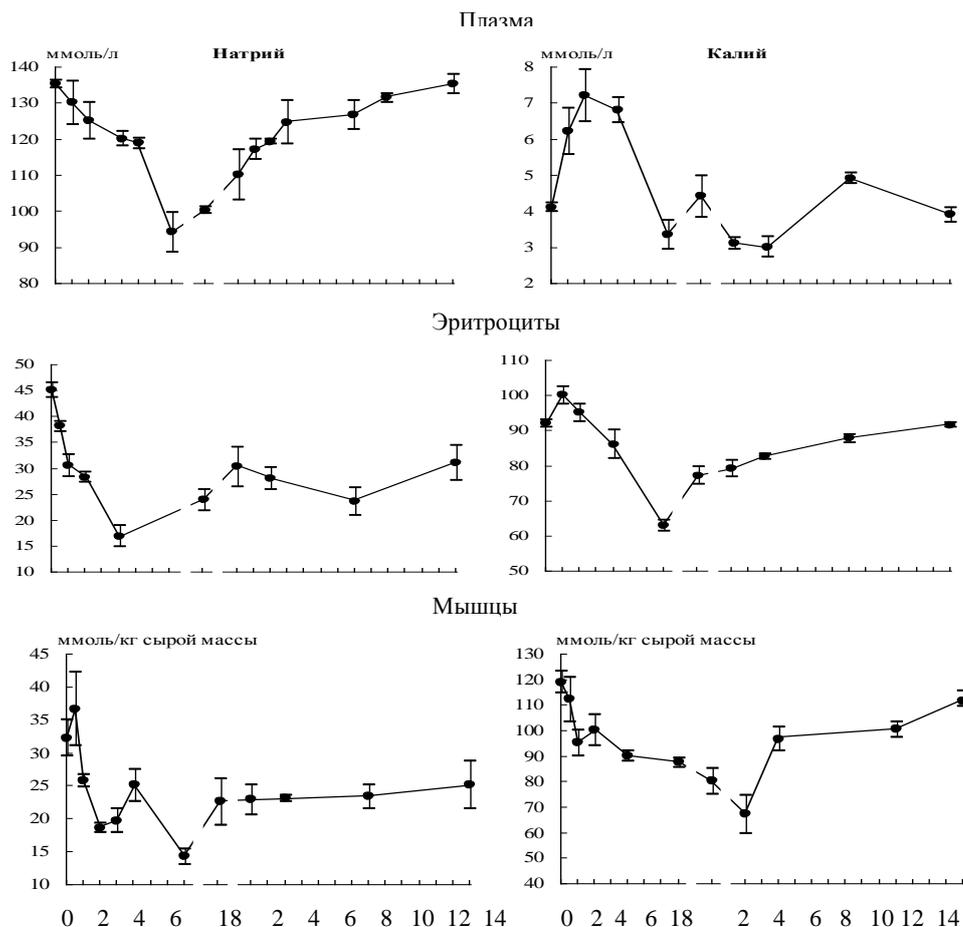


Рис. 3. Динамика содержания натрия и калия в плазме, эритроцитах, мышцах плотвы в ответ на отлов, 3х часовую транспортировку и в ходе акклимации к лабораторным условиям (Мартемьянов, 1982).

По оси абсцисс – время; ординат – содержание ионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краюшкина Л.С., Семенова О.Г., Панов А.А., Герасимов А.А. Функциональные особенности осморегуляторной системы молоди веслоноса *Polyodon spathula* (Polyodontidae) // *Вопр. ихтиологии*. 1996. Т. 36. № 6. С. 827-833.
2. Мартемьянов В.И. Стресс как источник ошибок при эколого-физиологических и биохимических исследованиях рыб // *Оценка погрешностей методов гидробиологических и ихтиологических исследований*. Рыбинск. 1982. С. 124-134.
3. Мартемьянов В.И. Диапазоны регуляции содержания ионов натрия, калия, кальция, магния в плазме, эритроцитах и мышечной ткани карпа *Cyprinus carpio* // *Ж. эволюц. биохимии и физиологии*. 1996. Т. 32. № 1. С. 37-43.
4. Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Пороговые концентрации катионов во внешней среде определяющие границы ареала речного рака в пресных водоемах // *Экология водных беспозвоночных. Сборник материалов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Ф.Д. Мордухай-Болтовского*. Ярославль: Принтхаус, 2010. С. 195-198.
5. Hegab S.A., Hanke W. Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stress // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. V. 71A. № 2. P. 157-164.
6. Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Threshold environmental concentrations of cations defining the range of roach *Rutilus rutilus* L. in freshwater reservoirs // *Inland Water Biology*. 2012. V. 5. №. 1. P. 91-95.
7. Rao G.M.M. Effect of activity, salinity, and temperature on plasma concentration of rainbow trout // *Can. J. Zool.* 1969. V. 47. P. 131-134.

8. Woo N.Y.S., Tong W.C.M. Salinity adaptation in the snakehead, *Ophiocephalus maculatus* Lacepede: changes in oxygen consumption, branchial Na^+K^+ -ATPase and body composition // J. Fish Biol. 1982. V. 20. № 1. P. 11-19.

MECHANISMS OF STABILIZATION OF THE IONIC HOMEOSTASIS OF THE INTERNAL ENVIRONMENT OF AQUATIC ORGANISMS UNDER CONSTANT AND EXTREME CONDITIONS

Martemyanov V.I.

Under constant conditions in tolerant range of various factors of environment parameters of water-salt homeostasis of freshwater aquatic organisms are adjusted in narrow limits, reflecting norm of reaction. In an initial stage of stress outflow of ions from the internal environment of an organism is observed. Counteraction to this harmful process is carried out due to acceleration of functions sodium the pump and K^+ - Cl^- -exchanger, ions strengthening an output from cells of organism.

ЗАВИСИМОСТЬ НУКЛЕИНОВОГО ГОМЕОСТАЗА КАРПА РАЗНОГО ВОЗРАСТА ОТ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ТОКСИКАНТОВ

О.Б. Мехед

*Черниговский национальный педагогический университет имени Т. Г. Шавченко
Чернигов, Украина, e-mail: mekhedolga@mail.ru*

Биохимические изменения в тканях рыб под воздействием токсикантов и их возрастные особенности имеют чрезвычайно важное значение в условиях интенсификации рыбоводства. Исследования показывают, что способность к кумуляции и особенности метаболических изменений в тканях разновозрастных рыб зависят от химического вещества которым представлен токсикант, ткани и возраста рыб (Бабушкина, 2010). Основная функция нуклеиновых кислот - сохранение и передача генетической информации - проявляется в биосинтезе белков. Неадекватно длительная или сильная функциональная нагрузка на клетку приводит к снижению содержания РНК (Магулка, 2010). Уменьшение площади ядер и концентрации в них РНК свидетельствует об усилении ее транспортировки из ядра в цитоплазму, а также о преобладании процессов распада над синтезом. Подобные нарушения могут спровоцировать изменения энергетического обмена. В результате дезорганизации клеточных и митохондриальных мембран, нарушения упорядоченности ферментных систем активизируется свободнорадикальный путь перекисного окисления. Нарушение нуклеинового гомеостаза может вызвать развитие трофических изменений со стороны различных органов, в то же время вопросы механизмов поддержания нуклеинового гомеостаза при токсикозе и его значение остаются открытыми. Медь является одновременно необходимым для жизнедеятельности микроэлементом и токсичным тяжелым металлом для многих живых клеток. Медь участвует в течении многих важных метаболических процессов и проявляет значительную бактериостатическое и бактерицидное действие благодаря повреждению плазматических мембран (Borkow, 2005). Механизм антибактериального действия меди основан преимущественно на нарушении структуры ДНК. Медь селективно связывается с гуанозиновыми остатками в молекуле ДНК (Sagripanti, 1996), в результате чего происходит разрыв одного или обеих цепей, а также модификация основ. Кроме того, существуют опасения о возможной связи между использованием пестицидов и развитием онкологических заболеваний как следствия изменений в структуре ДНК (Пидлиснюк, 2004).

Цель исследования - дать оценку динамики количественного спектра нуклеиновых кислот различных органов рыб при воздействии токсических условий содержания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были сеголетки и двухлетки карпа чешуйчатого (*Cyprinus carpio* L.) весом 100-150 и 350-400 г соответственно. Опыты проводились в модельных условиях в аквариумах объемом 200 дм³, в которых рыбу помещали из расчета 1 экземпляр на 40 дм³ воды. Период акклиматизации составлял трое суток. Рыбы содержались в условиях опыта в течение 14 суток, что является достаточным для формирования возможного адекватного ответа

организма (Хлебович, 1981). Температура воды поддерживалась в пределах +15 - +16 ° С, содержание растворенного кислорода - в пределах физиологической нормы. Воду в аквариумах меняли каждые 3 суток.

В эксперименте рыбы находились в четырех вариантах: контроль, действие бутилового эфира 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), зенкора и Cu^{2+} . Содержание в воде соответственно на 200 дм^3 : Cu^{2+} - 200 мг, зенкор - 57,2 мг, 2,4-Д бутиловый эфир 16 мг, что соответствует 2 ПДК (предельно допустимые концентрации). Для анализа использовали образцы печени, белых мышц и мозга.

Для исследования нуклеиновых кислот использовали методы количественного определения их содержания в исследуемом объекте и выделение их в чистом виде (Цанев, 1961). Содержание общего белка рассчитывали по методу Лоури (Lowry, 1951).

Статистическая обработка результатов проводилась общепринятыми методами с использованием стандартных компьютерных программ, а достоверность различий между средними арифметическими величинами определяли с помощью t-критерия Стьюдента (Лакин, 1990). Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при * - $P < 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрим результаты исследования количественного содержания нуклеиновых кислот, а также активность нуклеаз в тканях сеголетки карпа. Под воздействием 2,4-Д содержание ДНК в белых мышцах рыб уменьшается на 4%, одновременно количественные показатели РНК выросли на 53% ($P \leq 0,001$). В белых мышцах при действии зенкора содержание ДНК практически не изменяется, в то же время количество РНК уменьшилось в 2 раза ($P \leq 0,001$). В отличие от гербицидов, влияние ионов меди на карпа проявилось в существенном (28%, $P \leq 0,05$) увеличении количественного содержания ДНК и в незначительном повышении количества РНК, которое составляет 11% по сравнению с контролем.

Независимо от природы токсиканта, после четырнадцатисуточного пребывания в условиях токсикоза активность ДНКазы увеличивается, однако в разной степени: в 1,5 раза по сравнению с контролем под воздействием 2,4-Д ($P \leq 0,02$), на 1% и на 14% при действии зенкора и ионов меди соответственно. РНКазы под влиянием 2,4-Д также проявляет более высокую активность, чем соответствующий показатель у рыб контрольной группы (отличие составляет 19%). Влияние зенкора на данный показатель, проявляется в активации фермента на 18 % по сравнению с контролем. В то же время ионы меди почти не вызывают изменения активности РНКазы: $12,41 \pm 1,12$ и $12,22 \pm 4,02$ ИО / мг белка в контроле и при действии ионов меди соответственно.

При изучении содержания нуклеиновых кислот в печени под воздействием токсикантов отмечены значительные отклонения от нормы при токсическом действии зенкора - значительно уменьшается количество РНК (составляет лишь 37% от показателя рыб контрольной группы ($P \leq 0,001$)). При интоксикации 2,4-Д и Cu^{2+} содержание РНК и ДНК практически не изменялось и составляло 99% и 89% от количества ДНК рыб, которые находились в физиологических условиях. В то же время изменения количества РНК неоднозначны, и, хотя различия сравниваемых показателей недостоверны, можно проследить определенные тенденции: под воздействием 2,4-Д содержание РНК увеличилось на 11%, а под влиянием Cu^{2+} уменьшилось на 6% по сравнению с содержанием кислоты в ткани печени рыб контрольной группы.

Активность нуклеаз наименее выражена при действии меди (РНКазы 80%) также 2,4 - Д (РНКазы 98%). Активность ДНКазы приближается к контрольным значениям.

При сравнении контрольной группы с исследуемой наблюдали значительные отклонения от нормы при токсическом действии 2,4-Д - в тканях мозга содержание ДНК уменьшается на 37% ($P < 0,01$). При интоксикации Cu^{2+} содержание нуклеиновых кислот практически не изменялось, соответственно для ДНК составило 102%, а для РНК - 96%. Содержание РНК увеличивалось практически в 1,5 раза по сравнению с контролем при действии 2,4 - Д ($P < 0,05$), в то же время токсическое влияние зенкора проявлялось противоположно: содержание РНК существенно уменьшилось и составляло 55% от исходного показателя.

Активность нуклеаз наименее выражена при действии ионов меди (ДНКазы 102%, РНКазы 105%). Зенкор вызывал увеличение активности РНКазы на 43% относительно показателей контрольной группы рыб, и, хотя различия сравниваемых показателей недостоверны,

наблюдали рост активности ДНКазы и РНКазы на 31% и 17% под воздействием другого гербицида – 2,4-Д.

Таким образом, в результате анализа токсического воздействия гербицидов и ионов меди в тканях сеголетки карпа сделать вывод о значительных изменениях концентрации исследуемых количественных показателей нуклеиновых кислот. В то же время наблюдалось повышение активности рибонуклеаз, что является проявлением компенсационной реакции на действие токсикантов различной химической природы.

Исследуя содержание ДНК и РНК различных тканей двухлетки карпа при токсическом действии гербицидов и ионов меди можно отметить отсутствие существенных различий биохимического ответа организма рыб различного возраста на токсическое влияние 2,4-Д.

После 14 суток воздействия 2,4-Д содержание ДНК в белых мышцах двухлетки уменьшается на 16%, одновременно наблюдали незначительное увеличение РНК всего на 11% относительно контрольной группы. По токсическому действию зенкор отличается от предыдущего токсиканта - содержание РНК в этой ткани уменьшается в 2 раза ($P < 0,001$). Влияние ионов меди на двухлетку карпа по сравнению с показателями сеголетки проявляется в значительном повышении количественного показателя РНК в 2,5 раза ($P < 0,001$) относительно контроля, тогда как содержание ДНК увеличилось на 16%.

Независимо от природы токсиканта активность ДНКазы в мышечной ткани наименее выражена под действием ионов меди (95% от показателей контроля). Активность РНКазы также приближается к контрольным значениям.

Сравнив полученные данные содержания ДНК и РНК и активности нуклеаз в тканях печени карпа разного возраста можно сделать вывод, что значительное уменьшение содержания РНК наблюдались при действии зенкора как у сеголетки (РНК - на 63%), так и у двухлетки (РНК - на 36%) ($P \leq 0,02$). При воздействии 2,4 - Д и ионов Cu^{2+} содержание РНК существенно увеличилось, соответственно на 74% ($P \leq 0,001$) и на 69% ($P \leq 0,01$) по сравнению с показателями контрольной группы. Показатели количественного содержания ДНК под действием токсикантов различной природы в тканях печени карпа двухлетки приближаются к показателям рыб, которые находились в физиологических условиях.

ДНКазы под влиянием зенкора и ионов меди проявляет меньшую активность: 79% и 73% соответственно. Активность РНКазы приближается к показателям активности фермента у рыб контрольной группы.

Уровень ДНК в тканях (мозг, печень, белые мышцы) карпа разного возраста практически не изменяется и дает представление о количестве клеток в исследуемой ткани. Уровень ДНК зависит от количества разрушенных клеток, поскольку отражает степень деструкции. Уровень РНК изменчив. Он изменяется в зависимости от интенсивности функциональной активности клеток и характеризует ее способность к синтезу белка.

Анализируя содержание нуклеиновых кислот в тканях мозга при действии токсикантов отмечено значительные отклонения от нормы, при токсическом действии 2,4 - Д количество ДНК уменьшается на 24% относительно контроля ($P < 0,001$), тогда как содержание РНК увеличивается на 60%. При интоксикации ионами Cu^{2+} содержание нуклеиновых кислот возрастает, соответственно ДНК составляет 124%, РНК - 116% от контроля. Содержание РНК уменьшается по сравнению с контролем на 10% под влиянием зенкора.

Активность нуклеаз наименее выражена при действии меди (изменения составляют для ДНКазы 9%, РНКазы - 14% относительно показателя рыб контрольной группы). В то же время при действии зенкора активность РНКазы увеличивается на 31% относительно показателей контрольной группы.

ВЫВОДЫ

Как показывают исследования количественного спектра нуклеиновых кислот и нуклеазной активности в различных тканях *Cyprinus carpio L.* под воздействием токсических условий, выраженность изменений количества нуклеиновых кислот и активности нуклеаз характеризуется значительным изменением в зависимости от природы токсикантов, ткани и возраста исследуемых рыб. Обнаружена прямая зависимость между нарушениями нуклеинового гомеостаза и природой токсиканта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабушкина И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / И. В. Бабушкина, В. Б. Бородулин, Г. В. Коршунов и соавт. // Саратов. науч.-мед. журн. 2010. Т. 6, № 1. С. 11 – 14.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. М. : Высшая школа. 1990. 352 с.
3. Магулка І. В. Характеристика нуклеїнового гомеостазу в пацієнтів в різні періоди геморагічного інсульту / І. В. Магулка, Л. В. Андріюк // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія, 2010. № 3, С. 74 – 80.
4. Підліснюк В. В. Заборонені та непридатні до використання пестициди: стан та перспективи / В. В. Підліснюк, Т. В. Стирановська // Безпека життєдіяльності. 2004. № 6. С.23 - 28.
5. Хлебович В. В. Акклимация водных животных / В. В. Хлебович. Л. : Наука, 1981. 135 с.
6. Цанев Р. Г. К вопросу о количественном спектрометрическом определении нуклеиновой кислоты / Р.Г.Цанев, Г.Г. Марков // Биохимия. 1960. Т. 25, № 1. С. 151–159.
7. Borkow G. Copper as a biocidal tool / G. Borkow, J. Gabbay // Curr. Med.Chem. 2005. Vol. 12, No. 18. P. 2163 – 2175.
8. Lowry O.H. Determination of enzymes in the liver of the fish / O.H. Lowry, N.I. Rosebrough, A.I. Farr, R.I. Rendall // J. Biol. Chem., 1951. 193, № 1. P. 265– 275.
9. Sagripanti J.L. Cupric and ferric ions inactivate HIV / J.L. Sagripanti, M.M. Lightfoote // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1996. Vol. 12, No. 4. P. 333 – 337.

DEPENDENCE OF NUCLEIC HOMEOSTASIS CARP DIFFERENT AGE ON THE CHEMICAL NATURE TOXICANTS

O.B. Mekhed

Studied the quantitative range of nucleic acids and nuclease activity in various tissues *Cyprinus carpio* L. under the influence of toxic riverbed. Fish of various ages were under the influence of herbicides (2,4-D, metribuzin) and copper ions. The magnitude of changes in the number of nucleic acids and nuclease activity is characterized by a significant change, depending on the nature of the toxicant, fabrics and age of the studied fish. A direct relationship between impaired nucleic acid homeostasis and the nature of the toxicant.

АДАПТИВНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СЕРОТОНИН-МОДУЛИРУЕМОГО АНТИКОНСОЛИДАЦИОННОГО БЕЛКА В ТКАНЯХ РЫБ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

*А.А.Мехтиев, **Н.Дж.Мустафаев, *Г.М.Палатников.

*Институт физиологии им. А.И.Караева НАН Азербайджана, arifmekht@yahoo.com;

**Институт зоологии НАН Азербайджана, Баку.

Неблагоприятные факторы окружающей среды различной природы вызывают значительное изменение активности серотонинергической системы в тканях животных. Хроническая экспозиция рыб в воде, содержащей примеси меди (Handy, 2003) и ртути (Tsai et al., 1995), приводит к значительному снижению уровня серотонина в тканях животных. В исследованиях, проведенных на ракообразных, было показано, что длительная экспозиция животных в воде, содержащей примеси тяжёлых металлов и органических соединений, оказывает негативное воздействие на обмен серотонина, приводя к снижению его уровня (Fingerman et al., 1998). Вместе с тем, в ряде случаев факторы окружающей среды вызывают повышение активности серотонинергической системы. В этой связи представляло интерес выяснение направленности изменений уровня серотонинергической системы в тканях животных в зависимости от характера (позитивного или негативного) воздействия конкретного фактора на организм животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на бычках (*Neogobius fluviatilis*), обитающих в прибрежной зоне Каспийского моря и ведущих осёдлый образ жизни. Бычки (по 7 особей) были выловлены в двух зонах – в относительно чистой и в зоне, характеризующейся высоким уровнем

загрязнения железом, цинком и полиароматическими углеводородами. У животных брали пробы крови из хвостовой вены, делали мазки на предметных стёклах, окрашивали по Романовскому-Гимзе и под световым микроскопом подсчитывали количество микроядер в 2000 эритроцитов, пересчитывая полученное количество на 1000 клеток. Одновременно у животных забирали пробы печени, экстрагировали водорастворимые белки и определяли содержание серотонин-модулируемого антиконсолидационного белка (СМАБ; Мехтиев, 2000) методом непрямого твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах (Кетти, 1991). При проведении анализа в качестве антигенов использовали суммарные белки печени осетров, экстрагированные в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем 0,3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0,1%-ный тритон X-100 и доведённые до концентрации 20 мкг/мл с помощью 0,1 М буфера трис-HCl (рН 8,6). Каждую пробу дублировали трижды. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд (Скоупс, 1985). В качестве первых антител использовали кроличьи иммуноглобулины к СМАБ, а в качестве вторых антител противокроличьи козы иммуноглобулины с конъюгированной пероксидазой хрена. Визуализацию реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – 0,05%-ного раствора ортофенилендиамина в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере (рН 4,5). Реакцию останавливали через 20 мин после добавления субстрата путем приливания в лунки 3 М раствора NaOH, а результаты реакции считывали на фотометре для иммуноферментного анализа “StatFax 303” (Awareness, США) на длине волны 492 нм. Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента.

Во второй серии экспериментов, выполненных на годовалой молоди осетров (*Acipenser gueldenstaedti persicus*), животных разбили на 3 группы: 1) группа интактных животных (n=7); 2) группа животных, находившихся в течение 5 сут в пресной воде, содержащей нефть из месторождения «Нефтяные камни» в концентрации 100 мг/л (n=7); 3) группа животных, находившихся в течение 15 сут в пресной воде, содержащей нефть в той же концентрации (n=7). По завершении экспериментов у осетров брали пробы крови из хвостовой вены для проведения микроядерного теста, а также пробы печени для определения уровня СМАБ методом иммуноферментного анализа. Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента.

В третьей серии исследования осуществляли на особях воблы (*Rutilus rutilus caspicus*), леща (*Abramis brama orientalis*) и шемаи (*Chalcalburnus chalcoides*), отловленных в пресной (Мингечевирское водохранилище: вобла – 12 особей, лещ – 10 особей, шемая – 11) и солоноватой воде (ленкоранское побережье: вобла – 12 особей, лещ – 12 особей, шемая – 10 особей) и нефтечалинское побережье Каспийского моря: вобла – 13 особей). Рыб отлавливали в чистых зонах, вдали от нефтяных промыслов; отлов проводили в конце февраля – начале марта (преднерестовый период). Сразу после отлова у животных извлекали головной мозг, печень и жабры и использовали для определения уровня СМАБ методом иммуноферментного анализа. Результаты исследования усредняли по группам и сравнивали по t-критерию Стьюдента. Анализ проб воды, взятых из мест отлова исследованных рыб, осуществляли с помощью прибора для определения качества воды “U-22XD” (Horiba, Япония) и регистрировали такие показатели, как рН, уровень солёности, мутность, удельную плотность, и общее количество растворённых солей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

СМАБ был ранее идентифицирован в коре головного мозга и выделен из целого мозга крыс, определены его физико-химические свойства и участие в интегративной деятельности нервных клеток, в частности, в процессе консолидации следов памяти (Мехтиев, 2000). Биохимическими исследованиями, выполненными на коре головного мозга наркотизированных крыс (Мехтиев, 2000), и электрофизиологическими исследованиями, связанными с регистрацией нейрональной активности на идентифицированных командных нейронах моллюсков (Мехтиев и др., 2003), было показано, что содержание СМАБ в нервных клетках животных находится в прямой зависимости от уровня серотонина. Указанный факт позволяет оценивать внутриклеточную активность серотонинергической системы по уровню СМАБ в исследуемых тканях, а также целенаправленно воздействовать на активность этой системы путём введения в организм или антител к этому белку.

В результате проведенных исследований на бычках было установлено, что в микроядерном тесте количество микроядер в эритроцитах рыб из загрязнённой зоны значительно превышало их количество у животных из чистой зоны ($p < 0,001$; Рис.1А). При изучении содержания СМАБ в печени бычков было обнаружено его значительное снижение у животных, выловленных из загрязнённой зоны, по сравнению с животными из чистой зоны ($p < 0,001$; Рис. 1Б).

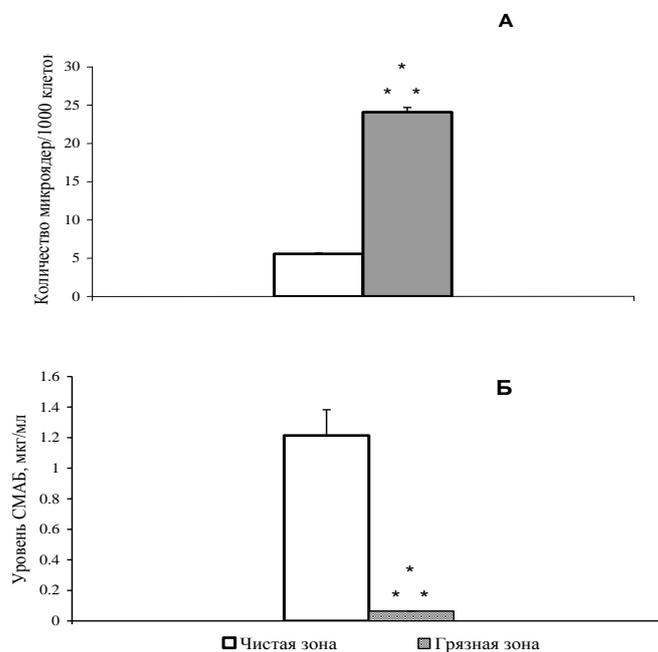


Рисунок 1. Уровень микроядер (А) в эритроцитах и СМАБ (Б) в печени бычков из чистой и грязной зон Каспийского моря. *** - $p < 0,001$.

В модельных экспериментах при экспозиции молоди осетров в загрязнённой нефтью воде в течение 5 сут не отмечалось увеличения уровня микроядер в эритроцитах (Рис. 2А). При этом уровень СМАБ в печени подопытных животных не отличался от контрольного (Рис. 2Б). В то же время в группе животных, содержащихся в загрязнённой нефтью воде на протяжении 15 сут, наблюдалось резкое увеличение количества микроядер в эритроцитах ($p < 0,01$; Рис. 2А), сопровождавшееся заметным снижением уровня СМАБ в печени ($p < 0,01$; Рис. 2Б). Следовательно, продолжительное воздействие неблагоприятного фактора химической природы на водные организмы истощает ресурсы адаптации их серотонинергической системы, что, в итоге, проявляется в возрастании уровня мутаций.

При анализе проб воды, забранных из мест отлова воблы, леща и шемаи, были получены данные, сведённые в таблицу. Из таблицы следует, что по показателям солёности и общему количеству растворённых в воде солей пробы, взятые с побережья Каспийского моря, в значительной степени превосходили пробы из водохранилища.

Таблица. Показатели качества воды из мест отлова рыб.

| Показатели | Мингчевирское водохранилище | Нефтечалинское побережье | Ленкоранское побережье |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| рН | 8,12 | 8,27 | 8,23 |
| Мутность, мг/л | 15 | 14 | 16 |
| Солёность, ‰ | 0,0 | 9 | 12 |
| Общее кол-во растворённых солей, г/л | 0,37 | 9 | 12 |
| Удельная плотность, г/л | 1000 | 1003 | 1008 |

В результате проведенных сравнительных исследований содержания СМАБ в головном мозге воблы, леща и шемаи, выловленных в пресной (Мингчевирское водохранилище) и

солонатовой (ленкоранское и нефтечалинское побережье Каспийского моря) воде было обнаружено значительное изменение уровня СМАБ под влиянием повышенной солёности.

В частности, его уровень в головном мозге воблы, выловленной в солонатовой воде (ленкоранское и нефтечалинское побережье Каспийского моря), был выше его уровня в пресной (Мингчевирское водохранилище; $p < 0,001$; Рис. 1).

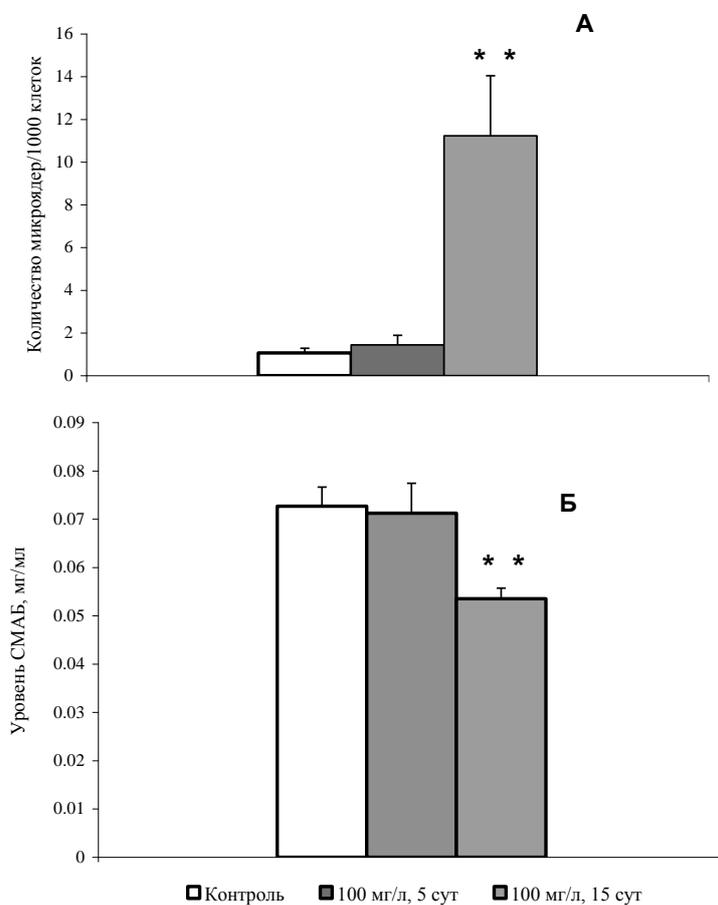


Рисунок 2. Влияние нефти на уровень микроядер в эритроцитах (А) и уровень СМАБ в печени (Б) у молоди осетров. ** - $p < 0,01$.

Аналогичный характер изменения содержания СМАБ отмечался в головном мозге особей леща: его уровень в головном мозге рыб, выловленных в солонатовой воде (ленкоранское побережье Каспийского моря), превышал значение этого показателя у рыб, выловленных в пресной воде ($p < 0,001$; Рис. 3). Повышение уровня СМАБ в головном мозге воблы и леща под влиянием солонатовой воды составляло 13,6% и 13,4%, соответственно. В головном мозге шемаи также наблюдалось повышение уровня СМАБ у животных, обитавших в морских условиях, по сравнению с животными, обитавшими в реке ($p < 0,01$; Рис.1), однако это повышение было значительно более резким, чем у воблы и леща, и составляло 36,5%. Анализ содержания белка СМАБ в печени леща и шемаи не выявил различий в его содержании у животных, выловленных в солонатовой и пресной воде. В тоже время в жабрах леща было обнаружено небольшое (4,1%; $p < 0,01$), а в жабрах шемаи – значительное (55%; $p < 0,001$) увеличение уровня СМАБ у животных, выловленных в солонатовой воде.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что длительное воздействие на организм гидробионтов неблагоприятных факторов химической природы приводит к истощению ресурсов и снижению активности серотонинергической системы. В то же время многолетняя и успешная адаптация пресноводных животных к новым условиям обитания, коими является морская среда, сопровождается повышением уровня её активности. Таким образом, уровень активности серотонинергической системы может являться хорошим индикатором адаптационного потенциала отдельной популяции животных к новым условиям обитания.

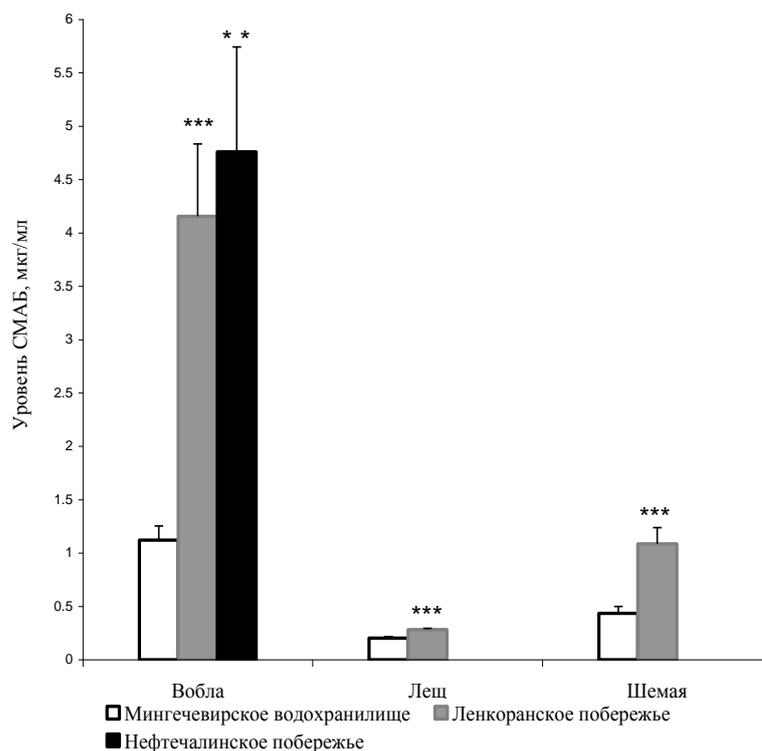


Рисунок 3. Уровень СМАБ в головном мозге рыб в пресной и солоноватой воде. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Мехтиев А.А. Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами // Бюллетень экспер. биол. мед. 2000. Т. 129; № 8. С.147-150.
2. Мехтиев А.А., Козырев С.А., Никитин В.П., Шерстнёв В.В. Избирательное влияние антител к белку SMP-69 на активность командных нейронов оборонительного поведения виноградных улиток // Российский физиол. журнал им. И.М.Сеченова. 2003. Т. 89; № 4. С.389-396.
3. Кетти Д. Антитела. Методы: Кн. 1 М.: Мир, 1991. 287 с.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков. - М.: Наука, 1985. с. 173-178.
5. Handy R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?//Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrated Physiology. 2003. V. 135; № 1. P. 25-38.
6. Tsai C.L., Jang T.H., Wang L.H. Effects of mercury on serotonin concentration in the brain of tilapia, *Oreochromis mossambicus*.// Neurosci Lett. 1995. V.194; №3. P. 208-211.
7. Fingerman M., Jackson N. C. and Nagabhushanam R. Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution.//Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1998. V. 120; № 3. P. 343-350.

ADAPTIVE CHANGES OF LEVEL OF SEROTONIN-MODULATING ANTICONSOLIDATION PROTEIN IN THE FISH TISSUES UNDER IMPACT OF ENVIRONMENTAL FACTORS

A.A.Mekhtiev, N.J.Mustafayev, G.M.Palatnikov.

The article concerns changes in the level of serotonin-modulating anticonsolidation protein (SMAP) in the fish tissues under impact of oil contamination and increased salinity of water. It was shown that under prolonged exposure to industrial pollution the level of SMAP downregulates significantly in fish liver in parallel to increase of mutation level (micronucleus analysis). Along with it, many-years dwelling in the sea of the fish species originally come from the fresh water milieu leads to upregulation of serotonergic system. The conclusion is made that the level of serotonergic system can be used as a reliable marker of adaptation potential of single population to novel dwelling conditions.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ КРОВИ РЫБ КАК ПОКАЗАТЕЛИ ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

Е.В. Микодина

*Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,
Москва, Российская Федерация
e-mail: mikodina@vniro.ru*

Потребность в оценке физиологического состояния рыб возникла достаточно давно - в первой половине XX века, в связи со становлением управляемого рыбного хозяйства, считая рыбоводство. Для её проведения вначале использовали биологические и морфометрические показатели, однако вскоре стало ясно, что их недостаточно для объяснения комплекса реакций рыб на различные абиотические и биотические воздействия и прогнозирования их жизнедеятельности. В России отдельные исследования в области физиологии рыб оформились в виде самостоятельного исследовательского кластера к концу 1980-х годов, пройдя ряд этапов. Ключевыми среди них явились: концепция экологической физиологии гидробионтов Строганова (1962), метод морфофизиологических индикаторов для определения состояния и прогноза развития популяций животных, в том числе рыб, а также метаболической регуляции их скорости роста и развития (Шварц и др., 1968), переход к биохимическим методам оценки миграционной активности и размножения рыб по их гормональному статусу (Баранникова, 1978), установление экологических закономерностей их общего и генеративного обмена веществ. Как результат сформулированы основные принципы физиолого-биохимических исследований вида на примере рыб (Шульман, Шатуновский, 1976) и обоснована необходимость разработки физиолого-биохимических основ рационального использования промысловых рыб и их искусственного разведения. Вышел в свет первый отечественный справочник по физиологии рыб (Яржомбек и др., 1986). В конце 1980-х гг. подведены первые итоги развития эколого-физиологических и физиолого-биохимических исследований рыб в нашей стране (Шульман, 1987). К этому же времени и в мировом научном сообществе сформировалась стратегия биохимической адаптации (Хочачка, Сомеро, 1988), согласно которой организм прибегает к ней тогда, когда у него «нет других, поведенческих или физиологических, способов избежать неблагоприятного воздействия среды», что свидетельствует о соответствии динамики развития отечественных физиолого-биохимических исследований рыб мировому уровню и темпу развития данного направления.

В период 1970-1990 гг. число исследователей и количество работ по физиологии и биохимии рыб увеличилось настолько, что возникла потребность в их регулярного обсуждения в рамках научных форумов разного ранга, в том числе международных. В это время в нашей стране с интервалом в 4 года организуется ряд национальных конференций, которые вначале проходят под эгидой экологической физиологии (Киев, 1976), а затем - экологической физиологии и биохимии рыб Вильнюс, 1985; Петрозаводск, 1992; Ярославль, 1997, 2000). Это свидетельствует не только об окончательном формировании данного научного направления, но и возникновении его новых актуальных разделов, таких как гормональная регуляция размножения рыб в искусственных условиях, иммунология рыб, физиология и биохимия осетровых рыб (Лукьяненко, 1971; Микряков, 1991), а также углублении методов оценки функционального статуса рыб. Как правило, в этот период определение биохимических показателей проводили с помощью трудоёмких лабораторных аналитических методов или комплектов тест-полосок, к чему имели доступ только высококвалифицированные исполнители в хорошо оснащенных и финансируемых лабораториях и институтах. Тем не менее, за несколько десятилетий исследований были созданы методологические и фундаментальные основы для определения различных биохимических показателей у рыб, накопилась определенная база данных для сравнительного анализа вновь получаемых результатов и их интерпретации.

В числе биохимических показателей, предложенных для использования в качестве индикаторов физиологического состояния рыб были общий биохимический и аминокислотные составы, фракционный состав белков, липидов и каротиноидных пигментов, гемоглобина, желчи, общий белок и белковый спектр цельной крови и её сыворотки, содержание белка, ДНК, РНК, гемоглобина, активность ряда ферментов (амилазы, протеазы, липазы, фосфатазы, Na^+/K^+ -

АТФазы, ДНКазы и РНКазы, эстеразы) и гормонов (ГТГ, тестостерон, эстрадиол, кортикостероиды - 11-оксикортикостероид (11-ОКС) и 17-оксикортикостероид (17-ОКС), основное количество которых представлено кортизолом и в меньшей степени – кортизоном, альдостероном и их метаболитами.

Органы и ткани рыб, в которых определяли величины тех или иных биохимических показателей были и остаются разнообразными: сыворотка и плазма крови, эякулят, ооциты, овулировавшая и развивающаяся икра, гонады на разных стадиях зрелости, мышцы, печень, желчный пузырь, пищеварительная система, гипофиз. Они были изучены в разные периоды онтогенеза рыб – эмбриональный, личиночный, мальковый, а также у неполовозрелых и половозрелых рыб. Объектами изучения были морские, пресноводные и эвригалитные виды, а также проходные и полупроходные рыбы. Видовой спектр объектов, подвергнутых исследованиям биохимическими методами, был и остаётся необычайно широким. Достаточно долгое время биохимические показатели изучали преимущественно у промысловых объектов – сельдёвых, тресковых, камбаловых, скумбриевых, нототениевых, карповых, используя их для установления направлений и путей миграции, локализации преднерестовых, нерестовых, промысловых скоплений, определения продолжительности нерестового периода, оптимального времени промысла, промысловой меры, организации и управления промыслом. Их результаты заложили теоретические основы современной физиолого-биохимической индикации функционального состояния рыб.

На этой базе с развитием системы расширенного искусственного воспроизводства и прудового выращивания ценных видов рыб предметом физиолого-биохимических исследований стали объекты рыбоводства. К ним относятся все виды азовских, каспийских, амурских осетровых, в т.ч. лопатоносов, благородных и тихоокеанских лососей (радужная форель, роды *Salmo* и *Oncorhynchus*), многие представители сиговых (сиги, ряпушка, хариус), карповых (белый и пестрый толстолобики, белый и чёрный амур, сазан, карп), камбалы, кефали и др. Цель этих исследований – создать биологические основы разведения рыб и оптимизировать процессы размножения, инкубации икры, подращивания личинок и молоди, выращивание товарной рыбы в искусственных условиях, обосновать новые этапы биотехники и новые биотехнологии аквакультуры.

Используя все накопленные ранее данные, в наши дни биохимические показатели применяют в качестве индикаторов (маркёров) состояния не только промысловых рыб и объектов рыбоводства, но и при мониторинге водных экосистем и популяций водных биологических ресурсов, изучении адаптаций рыб к экстремальным или новым условиям обитания после интродукции, при профилактике, диагностике и лечении заболеваний рыб, оценке иммунологического статуса, в водной токсикологии.

Конец 1990-х и начало 2000-х гг. ознаменовались усилением физиолого-биохимического направления в ихтиологии и, особенно, в рыбоводстве, для обозначения которого мировое сообщество стало использовать термин «аквакультура». Это связано с продовольственной безопасностью и мировым трендом в достижении обеспечения населения планеты рыбной продукцией по обоснованным медициной нормам с помощью аквакультуры, т.е. культивирования её объектов, в том числе рыб, в искусственно созданных условиях. С одной стороны, эти условия основаны на видовых преферендумам объектов культивирования, с другой – модифицированы с целью оптимизации сроков получения продукции и её качества. В любом случае среда обитания объектов аквакультуры является депривированной. Организм любого уровня организации, в том числе пойкилотермные низшие позвоночные - рыбы, реагирует на условия депривации стереотипно, одинаковыми биохимическими изменениями, назначение которых — адаптироваться к изменённым условиям среды. Факторы депривации различны, но являются своеобразными стрессорами, инициирующими в живом организме по принципу обратной связи каскад универсальных биохимических реакций, формирующих его физиологический ответ при адаптации к новому комплексу условий существования. Это означает, что влияние на рыб традиционных и новых биотехнологий аквакультуры можно оценивать по биохимическим показателям, формирующим ответную реакцию. Их количественные и качественные изменения характеризуют адаптивный ответ позвоночных и могут быть использованы как маркёры их физиологического состояния.

С развитием аквакультуры увеличилась потребность в регулярном определении большого количества биохимических показателей у большого количества объектов, а также определение их динамики. Так, в настоящее время известны физико-химические свойства многих белков крови рыб, однако, они малоинформативны и недостаточны для понимания рыбаками функционального состояния объектов разведения, принятия экстренных мер для коррекции патологий, а также оперативного принятия управленческих решений. При интерпретации результатов биохимического исследования рыб важно не только знать роль каждого показателя в метаболизме и регуляции функций у рыб, но и учитывать видовой, популяционный, половой, возрастной, экологический аспекты, период годового и жизненного циклов, а также величину показателя в норме. Поток информации увеличился настолько, что потребовалось обобщение имеющихся данных и новые методы для определения не исследованных ранее показателей. В связи с усилением влияния хозяйственной деятельности человека на водные экосистемы в настоящее время традиция конференций по экологической физиологии и биохимии рыб модифицировалась и конкретизировалась. Примером этого могут служить организуемые, начиная с 2003 г., регулярные конференции широкого профиля, посвященные «Проблемам иммунологии патологии и охраны здоровья рыб».

В последние годы появились данные о величинах неиспользованных или мало использованных ранее биохимических показателей рыб как объектов искусственного воспроизводства, например глюкозы крови, аланин- (АлАТ) и аспартатаминотрансфераз органов и тканей (АсАТ), а также практика применения экспресс-методов (например ИФА) их определения с помощью тест-наборов человека. Используя последние в сыворотке крови рыб – объектов аквакультуры, выявлены такие белки как ЛГ-и ФСГ-подобные гормоны, иммуноглобулин-подобные реактивности к иммуноглобулинам Е, G, А, М человека, С-реактивный белок и получены их значения в разных условиях. Как биохимические маркеры в настоящее время они найдут своё применение, прежде всего, в аквакультуре, где необходима быстрая диагностика и коррекция физиологического состояния производителей и потомства в норме и патологии, для контроля результатов селекционной и племенной работы, интродукции и натурализации объектов вселения, внедрения новых биотехнологий.

Заложенные в предыдущие годы основы изучения физиолого-биохимических закономерностей обмена веществ у рыб, определили новые концептуальные и методологические подходы к прогнозированию и коррекции их функционального состояния в условиях аквакультуры. Так, на основе установленных физиологических механизмов распознавания рыбами кормовых объектов, выявлены наиболее привлекательные и эффективно усваиваемые компоненты пищи, а также аттрактанты (Павлов, Касумян, 1990), что позволило с учётом видовых и онтогенетических потребностей рыб разработать новые рецептуры комбикормов, а также обосновать рационы кормления. Современные методы генетики и селекции позволяют создавать породы рыб для выращивания в условиях, отличающихся от естественных, как например, радужная форель для условий субтропиков Австралии. Используемые в аквакультуре породы рыб выведены путём отбора изменчивых фенотипов и зачастую являются высоко инбредными. Появились и изучаются трансгенные породы. Они являются биологической почвой для возникновения иммунологических заболеваний, увеличения частоты и тяжести инфекций, что в дальнейшем негативно сказывается на результатах культивирования. Исследование функционирования иммунной системы расширяет возможности рыбоводства за счёт получения гибридов и пород рыб, устойчивых к различным заболеваниям, создания и применения новых вакцин, иммуномодулирующих средств, пробиотиков. Это особенно важно в связи с запретом использования в рыбоводстве таких лекарственных агентов как антибиотики.

В современном мире мощный антропогенный пресс на водные экосистемы, в том числе на водоисточники рыбоводных предприятий, оказывают бытовые и промышленные стоки, содержащие различные поллютанты, такие как ПАВ, органические соединения (фенолы и др.), тяжёлые металлы и ксенобиотики. В загрязнение вносят вклад техногенные катастрофы (танкера Exxon Waldiz у морских берегов Аляски в 1989 г., танкера «Волгонефть-139» в Керченском проливе в 2007 г., нефтяной платформы «Deepwater Horizon» в Мексиканском заливе в 2010 г., химических заводов на р. Сунгари в провинции Цзилинь в КНР после взрыва в 2005 г., авария на Чернобыльской АЭС в 1986 г. и АЭС Японии в 2011 г.). При эколого-токсикологических

исследованиях и государственном мониторинге рыб уже используют как виды-индикаторы, а по биохимическим показателям гидробионтов судят не только о состоянии водной среды, но и изменениях в биоте (Немова и др., 2011).

Для обобщения, актуализации и увеличения имеющегося гигантского массива биохимических показателей рыб требуется систематизация полученных данных и усиление исследований по данному направлению. Для внедрения новых методов определения биохимических маркеров рыб может быть полезен опыт медицины, успешно использующей экспрессные методы для быстрого определения и интерпретации биохимических показателей крови человека с диагностической целью в сравнении с известными референсными данными. В связи с усилением антропогенного влияния на водные экосистемы, изменяющей качество рыбоводных водоисточников, интенсификацией аквакультуры и развитием её индустриальной составляющей, появлением новых биотехнологий и их влиянием на биологические и физиологические показатели рыб, для ихтиологии и рыбного хозяйства становятся актуальными задачи поиска новых достоверных биохимических маркеров рыб, принятия методов их экспрессного определения, обобщение и систематизация имеющейся базы данных, создание нормативных форм и референсных каталогов для регулярной и быстрой комплексной оценки и коррекции функционального состояния рыб в искусственных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранникова И.А. Функциональные основы миграций рыб. Л.: Наука, 1978. 210 с.
2. Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. М.: Пищ. Пром-ть, 1971. 360 с.
3. Микряков В.Р. Закономерности формирования иммунитета у рыб. Рыбинск: ИБВВ РАН СССР, 1991. 154 с.
4. Немова Н.Н., Ильмаст Н.В., Иешко Е.П. Эколого-биохимические особенности функционирования северных водных экосистем в условиях антропогенного загрязнения // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Борок – Москва, 2011. С. 591-598.
5. Павлов Д.С., Касумян А.О. Сенсорные основы пищевого поведения рыб // Вопр. ихтиологии, 1990. Т. 3. № 5. С. 720–732.
6. Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. Т. 1. М.: Изд-во МГУ, 1962. 444 с.
7. Хочачка С., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир, 1988. 568 с.
8. Шварц С.С. Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск: Урал. фил. АН СССР Ин-т экологии растений и животных, 1968. 386 с.
9. Шульман Г.Е., Шатуновский М.И. Основные принципы физиолого-биохимических исследований вида (на примере рыб) // Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. Вильнюс, 1976. С. 23–35.
10. Яржомбек А.А., Лиманский В.В., Щербина Т.В. и др. Справочник по физиологии рыб. М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1986. С. 192 с.

BIOCHEMICAL MARKERS OF THE FISH BLOOD AS INDICATORS OF THEIR PHYSIOLOGICAL STATUS IN AQUACULTURE

E.V. Mikodina

*Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography, Moscow, Russian Federation
e-mail: mikodina@vniro.ru*

The fish physiology and biochemistry investigations stages in Russia from the objects of fisheries to industrial fish aquaculture ones were observed. The traditional and new biochemical markers of fish are listed. Modern trends in the use of biochemical parameters of fish - aquatic toxicology and industrial aquaculture are accentuated. The necessity of the introduction of express methods for the determination biochemical fishes markers and the creation the reference databases of the physiological fish status is shown.

БАКТЕРИЦИДНЫЙ КАТИОННЫЙ БЕЛОК В КЛЕТКАХ КРОВИ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Т.В. Минзюк, Н.Н. Кавцевич

Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, г. Мурманск, Россия
e-mail: minzyuk@mail.ru

Важнейшими внутриклеточными компонентами, обеспечивающими бактерицидную активность лейкоцитов, являются неферментные катионные белки (КБ) и миелопероксидаза (МПО) (Пигаревский, 1978). Цитохимические исследования КБ и МПО имеют значение для оценки уровня неспецифической резистентности организма животных (Рулева и др., 2007).

В то же время, морфофункциональные свойства лейкоцитов крови морских млекопитающих, имеющих существенные отличия от наземных животных в характере и уровне аэробного и анаэробного метаболизма, изучены недостаточно.

В настоящей работе мы определяли содержание катионного белка в лейкоцитах периферической крови 3-х видов тюленей разного возраста а также дельфина афалины. Кроме того, у серого тюленя выявляли миелопероксидазу.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гренландский тюлень (*Pagophilus groenlandica* Erxleben, 1777) следующих возрастных групп: 1. бельки, возраст 1 неделя (n=38), 2а. серки, 1-1.5 месяца, "нормальные" – хорошо упитанные детеныши весом 30-35 кг (n=27), 2б. серки, 1-1.5 месяца, "заморыши" – весом 10-15 кг (n=36), 3. серки, 3-4 месяца (n=6), 4. взрослые животные (n=10). В условиях неволи получали кровь от 4 животных, содержащихся в аквакомплексе экспериментального морского полигона ММБИ в период 2001-2004гг.

Серый тюлень (*Halichoerus grypus* Fabricius, 1791): 1. новорожденные (n=8), 2. питающиеся молоком, 2-3 недели (n=6), 3. завершившие молочное питание, 1-1.5 месяца (n=12), 4. самостоятельно питающиеся рыбой щенки, 3-4 месяца (n=6), 5. взрослые животные, 1 год (n=4) и 3.5 года (n=2).

Тюлень-хохлач (*Cystophora cristata* Erxleben, 1777), 1-1.5 месяца (n=13).

Афалина (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821), взрослые животные (n=11).

Кровь у тюленей брали из внутрипозвоночной (экстрадуральной) вены, у дельфинов – из вен хвостового плавника. Фиксированные метанолом мазки окрашивали на катионный белок прочным зеленым FCF. Миелопероксидазу выявляли в реакции с бензидином. Препараты изучали на микроскопе Axio Imager M1, оснащенного цифровой видеокамерой AxioCam и программным обеспечением AxioVision (фирмы Zeiss), используя масляную иммерсию (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$). Для определения содержания катионного белка и миелопероксидазы в гранулоцитах крови вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК).

В зернистых лейкоцитах всех исследованных морских млекопитающих наблюдается гранулярное распределение катионного белка. Средняя площадь одной гранулы составляет 0.26 мкм^2 (у человека – 0.30 мкм^2). С возрастом происходит увеличение среднего числа окрашиваемых прочным зеленым гранул на клетку: у серого тюленя – от 95 (новорожденные) до 140 (взрослые), у гренландского тюленя – от 75 (бельки) до 155 (взрослые).

У щенков серого тюленя до 1.5 месяцев и гренландского – до 3-х число лейкоцитов, в которых выявляются катионные белки (КБ⁺лейкоциты), очень низкое (2-4.5%) (рис. 1). При этом у 19% серок гренландского тюленя 1-1.5 мес. гранулоциты, содержащие катионные белки, отсутствуют. Повышение содержания катионного белка у гренландских тюленей происходит позднее (3-4 мес.), чем у серых тюленей (1-1.5 мес.). Это проявляется в возрастании числа КБ⁺лейкоцитов и содержащихся в них гранул и, по-видимому, обусловлено физиологическими перестройками, связанными с голоданием детенышей тюленей после молочного вскармливания и последующим переходом на самостоятельное питание рыбой. Содержание КБ у взрослых гренландских тюленей в 2 раза выше, чем у серых (рис. 1).

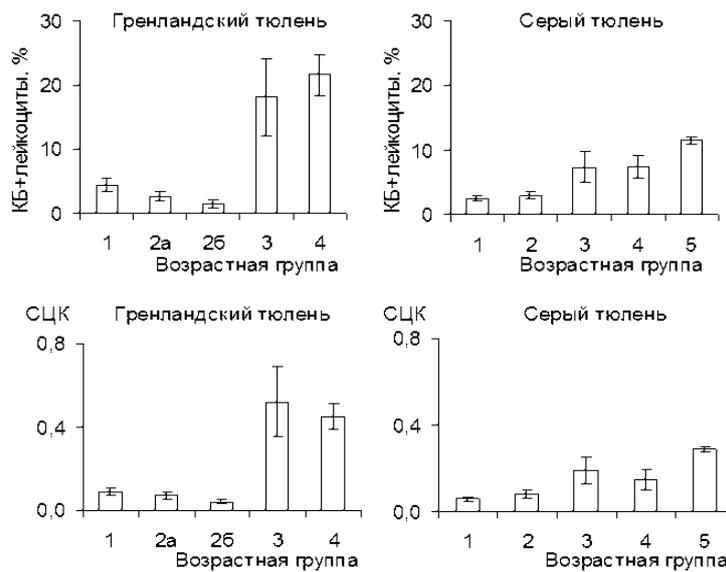


Рис. 1. Содержание катионного белка в гранулоцитах тюленей.

У щенков хохлача в возрасте 1-1.5 месяцев количество КБ⁺лейкоцитов и содержащихся в них лизосомных гранул выше по сравнению с серыми и гренландскими тюленями (рис. 2). Вероятно, в этот период происходит резкое увеличение бактерицидной активности лейкоцитов, поскольку колебания СЦК в данной возрастной группе у хохлача наиболее значительны.

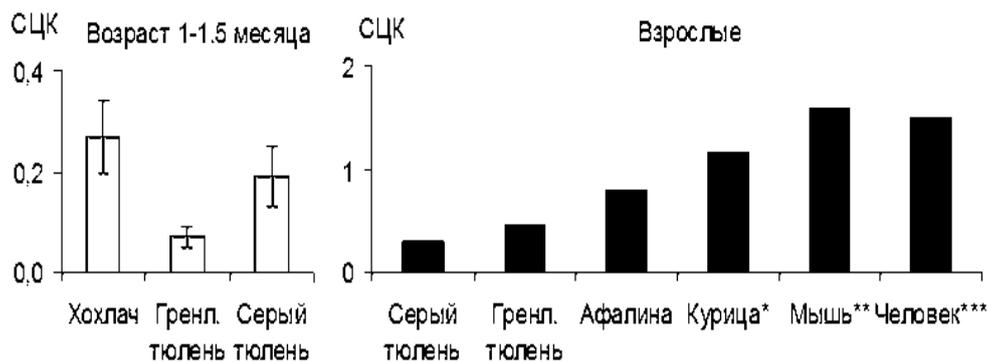


Рис. 2. Содержание катионного белка в гранулоцитах разных видов животных (курица, мышь и человек по: *Клетикова, 2010, **Будька и др., 2009, ***Стойко, Ермаков, 2004).

У тюленей на всех исследованных возрастных этапах очень низкое содержание КБ по сравнению с другими видами животных и человеком (рис. 2).

В то же время, количество бактерицидного белка у дельфинов афалин в 2 раза выше, чем у изучаемых нами тюленей, но ниже по сравнению с человеком (рис. 2). Вероятно, это связано с происхождением и более продолжительной эволюционной историей китообразных (70-80 миллионов лет против 10 у ластоногих).

Изучение гренландских тюленей, содержащихся в условиях неволи в течение длительного времени, показало индивидуальные различия между животными по количеству КБ (рис. 3). В возрасте 3-4-х месяцев у тюленей №2 и №4 содержание КБ повышалось до 0.5, что близко к показателям животных в естественной среде обитания. В данной возрастной период тюлени переходят на самостоятельное питание рыбой как в природных условиях, так и в неволе. Самое низкое содержание катионного белка наблюдалось у животного №3, которое было истощено и в дальнейшем погибло. У взрослых плененных гренландских тюленей содержание бактерицидного катионного белка в 2.6 раза ниже (СЦК=0.17±0.03), чем у диких животных (СЦК=0.45±0.06).

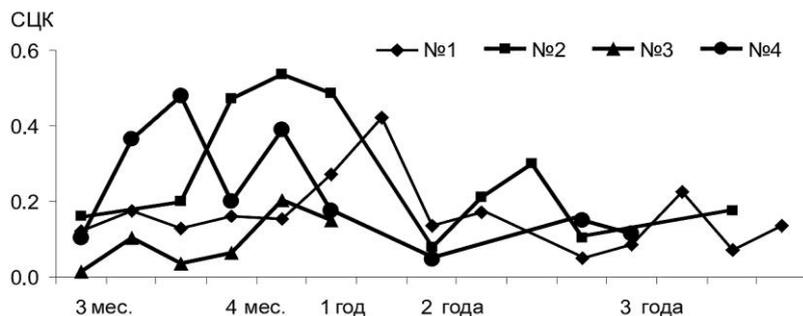


Рис. 3. Возрастные изменения содержания катионного белка в гранулоцитах гренландских тюленей в условиях неволи.

Согласно полученным данным, у тюленей в начальные периоды постнатального онтогенеза содержание катионного белка в гранулоцитах очень низкое. С возраста 3 мес. у гренландского тюленя и с 1-1.5 месяцев – у хохлача и серого тюленей происходит интенсивное увеличение числа КБ⁺лейкоцитов и содержащихся в них лизосомных гранул. При этом показано, что возрастание показателей фагоцитоза у щенков серых и гренландских тюленей происходит несколько раньше, в период молочного питания (Frouin et al., 2010).

Максимальный бактерицидный эффект достигается при совместном действии катионного белка и миелопероксидазы (Пигаревский, 1978). Неферментные катионные белки проявляют бактерицидную активность в анаэробных условиях. МПО участвует в галогенизации белков бактерий (Рулева и др., 2007; Рязанцева, 2009), а также, являясь ферментом АОС, обеспечивает защиту организма от окислительного стресса (Галанцев и др., 1999; Коваленко и др., 2004). Предполагают также, что ферменты АОС, в частности пероксидазы, участвуют в освобождении эндогенного молекулярного кислорода для поддержания аэробных процессов при апноэ (Баранова и др., 2010).

Окрашенный продукт цитохимической реакции при выявлении МПО в лейкоцитах серых тюленей характеризуется диффузно-гранулярным распределением. Средний размер зерен в нейтрофильных гранулоцитах составляет 0.42 мкм², в эозинофильных гранулоцитах они крупнее – 0.55 мкм².

У ныряющих млекопитающих различных видов (норки, ондатры, дельфины) активность ферментов АОС выше, чем у наземных животных. Согласно полученным нами результатам, активность миелопероксидазы в лейкоцитах серого тюленя также высока. Кроме того, с возрастом она снижается (рис. 4): от 2.51 (новорожденные) до 1.91 (взрослые). У взрослого серого тюленя, имеющего опыт погружений под воду, активность фермента самая низкая. Вероятно, на ранних этапах онтогенеза тюленей ведущую роль в регуляции активности миелопероксидазы играет микрофлора среды, в которую попадают детеныши после рождения. У щенков тюленей, длительное время (1-1.5 месяцев) находящихся на суше, одной из основных функций МПО может быть обеспечение неспецифических защитных реакций лейкоцитов. Высокая активность МПО у новорожденных тюленей обусловлена, вероятно, жизненно важной ролью этого фермента в АОС в период внутриутробного развития.

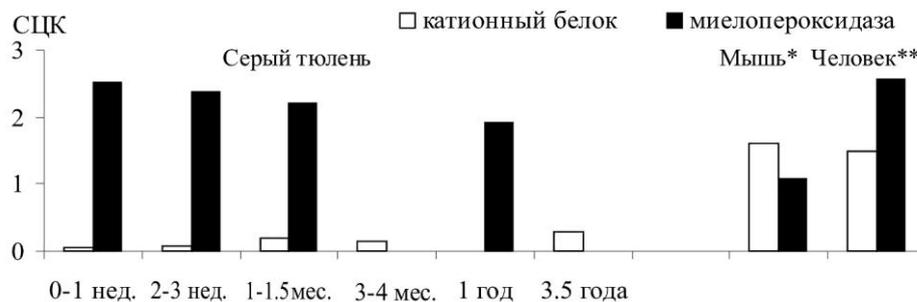


Рис. 4. Содержание катионного белка и миелопероксидазы в гранулоцитах серых тюленей разного возраста (мышь и человек по: *Будыка и др., 2009; **Палагнюк, 2003 (МПО); Стойко, Ермаков, 2004 (КБ)).

Таким образом, содержание бактерицидного катионного белка у исследованных морских млекопитающих значительно ниже, чем у наземных животных. Ведущую бактерицидную роль у водных млекопитающих, в особенности, на ранних этапах постнатального онтогенеза, вероятно, играет миелопероксидаза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова Т.И., Коваленко Р.И., Митрофанова А.В., Январева И.Н. Динамика показателей энергетического метаболизма при адаптации к нырянию у человека // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 5. С. 411–419.
2. Будька Д.А., Абзаева Н.А., Руднев С.М. и др. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей, привитых против чумы, и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. Т. 100. С. 50–56.
3. Галанцев В.П., Коваленко Р.И., Кузьмин Д.А., Лощагин О.В. Исследование резистентности ондатры *Ondatra Zibethicus* к гипоксическим воздействиям при нырянии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1999. Т. 35, № 2. С. 156–157.
4. Клетикова Л.В. Содержание катионных белков в гранулоцитах птиц // Естествознание и гуманизм. 2010. Т. 6, № 1. С. 51–52.
5. Коваленко Р.И., Цой Е.М., Кузьмин Д.А. Функциональная активность нейтрофилов и состояние тканевых систем перекисного окисления липидов у ондатр при нитритной гипоксии // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Матер. межд. конф. (6-9 сент. 2004., г. Петрозаводск). Петрозаводск, 2004. С. 65–66.
6. Палагнюк В.Г. Цитохимическая диагностика острых лейкозов // Террас Медика. 2003. Т. 2. № 2.
7. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М.: Медицина, 1978. 128 с.
8. Рулева Н.Ю., Звягинцева М.А., Дугин С.Ф. Миелопероксидаза: биологические функции и клиническое значение // Современные наукоемкие технологии. 2007. № 8. С. 1–4.
9. Рязанцева Л.Т. Миелопероксидаза: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов // Вестник Воронежского государственного технического университета. 2009. Т. 5. № 9. С. 85–88.
10. Стойко Ю.М., Ермаков Н.А. Клинические и фармакоэкономические аспекты консервативного лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Хирургия, приложение к Consilium Medicum. 2004. Т. 6, № 2. С. 23–26.

BACTERICIDAL CATIONIC PROTEIN IN MARINE MAMMAL BLOOD CELLS

T.V. Minzyuk, N.N. Kavtsevich

The contents of bactericidal cationic protein is considerably lower in investigated species of aquatic mammals than in terrestrial animals. Within the first months of gray seals life the contents of cationic proteins increases, and activity of myeloperoxidase decreases. It is supposed, that myeloperoxidase plays leading bactericidal role in water mammals, in particular, at early postnatal ontogenesis.

ВКУСОВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ КЛАССИЧЕСКИХ ВКУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ У ЖЕМЧУЖНОГО ГУРАМИ, *TRICHOGASTER LEERI*

Е.С. Михайлова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
elena_mikhailova@mail.ru

За последние годы были определены вкусовые предпочтения многих видов рыб средней широты. Большинство видов характеризуются строго специфичными спектрами адекватных стимулов и лишь у некоторых видов, близких как по систематике, так и по образу жизни, может наблюдаться значительное сходство вкусовых предпочтений (Kasumyan, Døving, 2003). Однако отношение к классическим вкусовым веществам в большей степени зависит от общей направленности питания, так, например, если значительную долю рациона рыб составляют насекомые, то наблюдается значительное предпочтение гранул с хлористым кальцием. Для нашей работы мы выбрали тропический вид рыб, широко используемый в аквариумистике.

Опыты проводили на базе каф. Ихтиологии биологического факультета Московского государственного университета в декабре 2011- января 2012. В опытах использовались половозрелые особи жемчужного гурами, *Trichogaster leeri*, *Bleeker*, L - 50-55мм, 1.6 – 1.7г.

Рыб, после приобретения в зоомагазине, содержали в общем аквариуме, объемом 100 л. Затем рыб рассаживали по отдельным аквариумам, 10л, снабженным терморегуляторами AquaEL EH-25W. Рыбы содержались при естественном режиме освещения, $t_{\text{воды}} - 26^{\circ}\text{C}$. Кормление проводилось живым кормом (личинками хирономид) один раз в день, после завершения работы.

В первые 1-2 дня рыб приучали схватывать подаваемый корм и вносимые поштучно гранулы (длина 4 мм, диаметр 1.35 мм) из агар-агарового геля (2%), содержащие водный экстракт Chironomidae (175 г/л) и краситель Ponceau 4R (5 мкМ). В опытах проверялась реакция рыб на классические вкусовые вещества (сахарозу, лимонную кислоту, хлориды натрия и кальция), которые у человека вызывают ощущение сладкого, кислого, соленого и горького, соответственно (табл. 1). Контрольные гранулы содержали только краситель. В каждом опыте регистрировали потребление, число повторных схватываний и длительность удержания рыбой гранулы после первого схватывания и суммарно за все время опыта. Гранулы разного типа подавали в случайной последовательности. Детально технология изготовления гранул приводилась ранее (Kasumyan, Mikhailova, 2005).

Всего было выполнено 483 опыта. Статистический анализ результатов проведен с использованием критерия χ^2 , t -критерия Стьюдента и рангового коэффициента корреляции Спирмена (r_s).

Полученные результаты показали, что экстракт Chironomidae и сахароза оказывали стимулирующее действие на потребление гранул жемчужным гурами, остальные вещества составили группу индифферентных вкусовых стимулов и не оказывали значимого эффекта на потребление гранул (табл. 1). Рыбы дольше удерживали гранулы с привлекательными по вкусу стимулами как после первого схватывания, так и в течение всего опыта. Гранулы с хлористым кальцием и хлористым натрием напротив меньше удерживались рыбами как после первого схватывания, так и в течение всего опыта, причем второй показатель имел достоверное отличие от контрольного показателя.

Таблица 1. Вкусовые ответы жемчужного гурами на классические вкусовые вещества.

| Раздражитель | Концентрация, М (%) | Потребление гранул, % | Число схватываний | Продолжительность удержания гранулы, с | | Число опытов |
|-----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|--|-----------------------|--------------|
| | | | | после первого схватывания | в течение всего опыта | |
| Сахароза | 0.29 (10) | 51.2 ± 5.6*** | 2.6±0.4 | 3.1±0.4** | 5.8±0.4 | 82 |
| Лимонная кислота | 0.26 (5) | 18.3 ± 4.3 | 3.2±0.4 | 1.5±0.2 | 5.5±0.8 | 82 |
| Хлористый натрий | 1.73 (10) | 9.6 ± 3.5 | 1.7±0.2*** | 1.3±0.1 | 2.3±0.3*** | 73 |
| Хлористый кальций | 0.9 (10) | 6.1 ± 3.0 | 1.7±0.2*** | 1.4±0.1 | 2.6±0.3** | 66 |
| Экстракт Chironomidae | 175.0 | 90.5 ± 3.0*** | 3.4±0.2 | 4.1±0.5*** | 13.8±0.7*** | 95 |
| Контроль | - | 12.9 ± 3.7 | 3.3±0.4 | 1.7±0.3 | 5.8±0.8 | 85 |

Примечание. Концентрация экстракта мотыля выражена в г/л. *, **, *** - достоверность различий, соответственно $P > 0.95$, 0.99 , 0.999 по отношению к контролю.

Привлекательность сахарозы была ожидаема нами. По литературным данным, в рацион жемчужного гурами в значительной доле входит растительная компонента (Axelrod, Vorderwinkler, 1995). А как было показано ранее, рыбы, потребляющие растительный корм, проявляют положительное отношение к сахарозе (Касумян, Николаева, 1997). Низкое потребление хлористого кальция, наоборот, оказалось довольно неожиданным, так как часто

упоминается, что жемчужные гурами даже выпрыгивают из аквариумов за летающими насекомыми (Axelrod, Vorderwinkler, 1995). По-видимому, все же доля насекомых в рационе жемчужного гурами не велика.

Гурами обитают в сильно заросших водоемах со слабым течением. В таких условиях становятся возможными многократные тестирования кормовых объектов, что и демонстрируют нам рыбы в эксперименте. Гранулы как с привлекательными, так и с индифферентными по вкусу веществами одинаково многократно тестировались рыбами. Наибольшее число повторных схватываний наблюдалось в опытах с экстрактом Chironomidae, до 7-8 схватываний.

Между потреблением гранул и временем их тестирования, как после первого схватывания, так и в течение всего опыта, наблюдается достоверная положительная корреляция ($r = 0.99$, $p < 0.001$; $r = 0.92$, $p < 0.01$, соответственно).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 10-04-00349) и Программы «Ведущие научные школы» НШ-186.208.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kasumyan A.O., Døving K.B. 2003. Taste preferences in fish // *Fish and Fisheries*. V. 4. P. 289-347.
2. Kasumyan A.O., Mikhailova E.S. 2005. The comparison of taste preferences and behavioral taste response in nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* from the Moscow River and the Wight Sea basins // *Fish chemosenses*. K. Reutter and B. G. Kapoor (eds.). Enfield: Science Publishers, Inc., P. 305-324.
3. Касумян А.О., Николаева Е.В. 1997. Вкусовые предпочтения гуппи, *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes) // *Вопр. ихтиологии*. Т. 37. № 5. С. 696 – 703.
4. Axelrod H. R. and Vorderwinkler W. 1995 *Encyclopedia of tropical fishes with special emphasis on techniques of breeding*. T. F. H. Publications, Neptune City., 762 p.

TASTE PREFERENCES OF CLASSICAL TASTE SUBSTANCES BY PEARL GOURAMI, *TRICHOGASTER LEERI*

E.S. Mikhailova
Moscow State University named for M.V. Lomonosov

ОЦЕНКА ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ВСЕЛЕНИЯ КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* В БАРЕНЦЕВО МОРЕ

Мищенко Е.С., Порцель М.Н., Новиков В.Ю., Мухин В.А.
*Полярный научно-исследовательский Институт морского рыбного хозяйства и океанографии
(ПИИРО) им. Н.М. Книповича, Мурманск, Россия
e-mail: vmukhin@pinro.ru*

Тема последствий акклиматизации крупных крабов в Баренцевом море достаточно широко обсуждалась в научной литературе с «макроэкологической» точки зрения. Подробно изучалось влияние вселенцев на состояние популяций различных промысловых объектов, главным образом, тресковых рыб.

Цель настоящей работы - взглянуть на эту проблему, с «микроэкологической», т.е. с эколого-биохимической точки зрения.

По мнению биохимиков, вселение живых организмов в экологическую систему, по сути – есть введение в эту систему дополнительных органических веществ. С этой позиции, вселение крабов, это введение белков, жиров и углеводов (хитина).

Наибольшие последствия может повлечь за собой внесение в экологическую систему именно хитина, т.к. в отличие от белков и жиров, хитин – «жесткоструктурированный» полисахарид, биодegradация которого осуществляется, главным образом, специализированными хитинолитическими микроорганизмами. Путь ферментативного расщепления хитина был ранее подробно обобщен нами (Новиков и др., 2007) (рис. 1).



Рис. 1. Основные пути ферментативного превращения хитина в природе.

Механизм бактериального разложения хитина также изучен. Бактерии присоединяются к хитинсодержащим частицам и гидролизуют осадочные биополимеры с помощью вырабатываемых клеткой эндо- и экзоферментов, выделяемых в микропоры осадка. Низкомолекулярные продукты гидролиза затем ассимилируются связанными с частицей бактериями или выделяются в окружающую воду.

Вероятно, в природе существует некоторое равновесие между числом ракообразных и хитинрасщепляющих бактерий. Рост последних не только ускоряет биологическую утилизацию хитина, но и способствует снижению роста популяции ракообразных за счет уменьшения их выживаемости при заболеваниях панциря.

Внесение в Баренцево море значительного количества этого вещества может привести к нарушению равновесия и спровоцировать два существенных изменения в окружающей среде:

- учитывая низкую температуру северных морей и малое по сравнению с южными морями содержание хитиновых (как и других) бактерий, возможно накопление хитина на дне;
- высокое содержание хитинсодержащих отходов на дне может вызвать быстрый рост хитиновых бактерий, что, как следствие, приведет к увеличению заболеваний панцирем ракообразных.

Среди морских бактерий для крабов представляют реальную опасность те из них, которые обладают хитинолитическими свойствами, - *Vibrio* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium* sp. и другие. Эти бактерии способны лизировать хитин внешних покровов ракообразных, вызывая тяжелое заболевание у животных.

Болезнь, вызываемая микроорганизмами, имеющими хитинолитические свойства, встречается у многих видов ракообразных Мирового океана. Вызываемые хитинолитическими бактериями поражения панцирных покровов ракообразных называют хитинолитической бактериальной болезнью панциря крабов (Chitinolytic bacterial shell disease of crabs). Это наиболее широко распространенное бактериальное заболевание ракообразных (Рязанова, 2005; Рязанова, 2006). У камчатского краба в северо-восточных регионах Тихого океана заболевание известно с 1960 г. (Sindermann, Lightner, 1988). Болезнь характеризуется прогрессирующим смягчением и разрушением хитина экзоскелета, почернением некротических участков как следствие вторжения хитинолитических бактерий. Локальный лизис быстро прогрессирует и, сливаясь воедино, захватывает всю область тигумента. Это ведет к размягчению, рыхлости и разрушению хитина. Дистальные части пораженных конечностей обламываются, особенно у молодых крабов. Распространение лизиса внутрь открывает путь вторичной бактериальной и грибковой инфекции (Lightner, 1981). Патологические изменения органов у ракообразных с сильной степенью поражения панцирной болезнью, очевидно, ведут к гибели животных (Стексова, 2003).

Следует оценить «масштаб бедствия», т.е. объем дополнительного хитина, поступающего в систему Баренцева моря в связи с вселением крабов.

По оценке, произведенной специалистами ПИНРО, биомасса *Paralithodes camtschaticus* составляет 250-260 тыс. тонн, *Chionoecetes opilio* – ок. 300 тыс. тонн (Баканев, Павлов, 2010). При этом следует учитывать, что камчатский краб сосредоточен, главным образом, в южной части Баренцева моря на площади порядка 120 тыс. км², а краб-стригун опилио расселен более равномерно на всей акватории Баренцева моря, на площади порядка 400 тыс. миль². Рассчитав суммарную биомассу крабов на площадь расселения мы получаем значение порядка 2,4 т крабов-вселенцев на 1 км² акватории южной части Баренцева моря. Много это или мало?

Для этого попытаемся рассчитать биомассу хитинсодержащих организмов, традиционно населяющих Баренцево море (общая площадь 1,424 млн. км²). Нам известно, что биомасса зоопланктона в Баренцевом море, включая микро-, мезо- и макрозоопланктон перманентно составляет порядка 110 млн. т. (Дробышева, 1994; Жизнь и условия..., 1985).

Вероятно, сюда следует добавить 4 млн. тонн креветки *Pandalus borealis* и незначительное количество крабов-аборигенов родов *Hyas* и *Lythodes*, составляющих бентосное сообщество. Дальнейший несложный расчет показывает, что среднегодовая биомасса всех хитинсодержащих организмов в Баренцевом море составляет ок. 81,7 т/км², т.е. биомасса вселенцев не превышает даже 3 %. Даже учитывая тот факт, что содержание хитина в крупных ракообразных (табл. 1) превосходит таковое в зоопланктоне, данной величиной можно было бы пренебречь.

Таблица 1. Химический состав сырья (массовая доля, %)

| Наименование компонента | Краб-стригун | Северный криль | Северная креветка | Камчатский краб |
|------------------------------|--------------|----------------|-------------------|-----------------|
| Вода | 82,15 | 73,49 | 76,2 | 78,4 |
| Белок | 14,65 | 14,13 | 15,94 | 11,60 |
| Хитин | 1,05 | 0,70 | 1,12 | 1,60 |
| Минеральные вещества (зола) | 1,65 | 1,98 | 3,40 | 3,70 |
| Липиды (включая каротиноиды) | 0,50 | 9,70 | 3,34 | 2,80 |

С другой стороны, вселенцы являются членами бентосного сообщества. Бентосные сообщества более замкнуты и консервативны по видовому и численному составу организмов. Расчет биомассы хитинсодержащих организмов показал, что на долю вселенцев в бентали приходится около 50 %, а это уже существенно!

Кроме того, по данным бентосных исследований ПИНРО в районах промысловых скоплений доля крупных промысловых крабов многократно возрастает (рис.2).

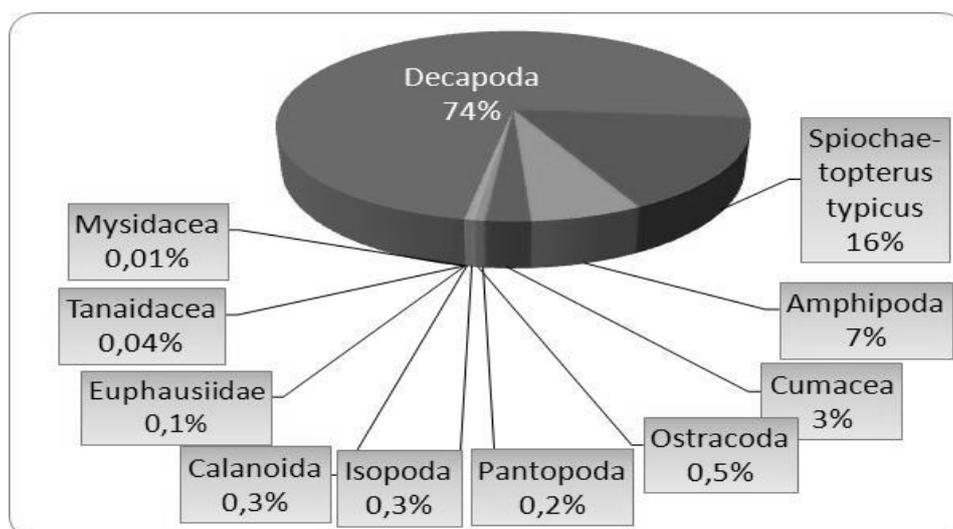


Рис. 2. Соотношение биомассы хитин-содержащих таксонов в районе промысловых скоплений камчатского краба (в районе Канинской банки, Мурманского мелководья и Восточного Прибрежного района) по данным бентосных исследований ПИНРО 2003 г.

Средняя биомасса хитин-содержащих таксонов с учетом камчатского краба и в пересчете на «живой вес» в целом по району оценена в $8,52 \pm 1,43$ г/м². Из десятиногих раков (Decapoda), доминирующих среди хитин-содержащих организмов по биомассе, более 90 % приходится на камчатского краба, и лишь несколько % составляют крабы р. *Huys* и креветки (Anisimova et al., 2011).

Проблема усугубляется тем, что камчатский краб является объектом, промысел и переработка которого ведется на весьма ограниченном ареале. Так, в 2007-2008 гг. интенсивность вылова составляла порядка 350 т на 89 км² (около 4 т/км²) (Баканев, Павлов, 2010). Отходы переработки, составляющие по массе до 50 %, также сбрасываются на ограниченной акватории, а, следовательно, масштабы «экологического пресса» могут быть значительно выше.

Следующий важный вопрос. С какой скоростью расщепляется хитин в Баренцевом море в естественных условиях?

Для ответа на этот вопрос мы поставили несколько лабораторных экспериментов. Хитин в десятикратном избыточном количестве, относительно его содержания в естественных условиях, инкубировали с грунтом, взятом из различных литоральных участков Баренцева моря (рис. 3).

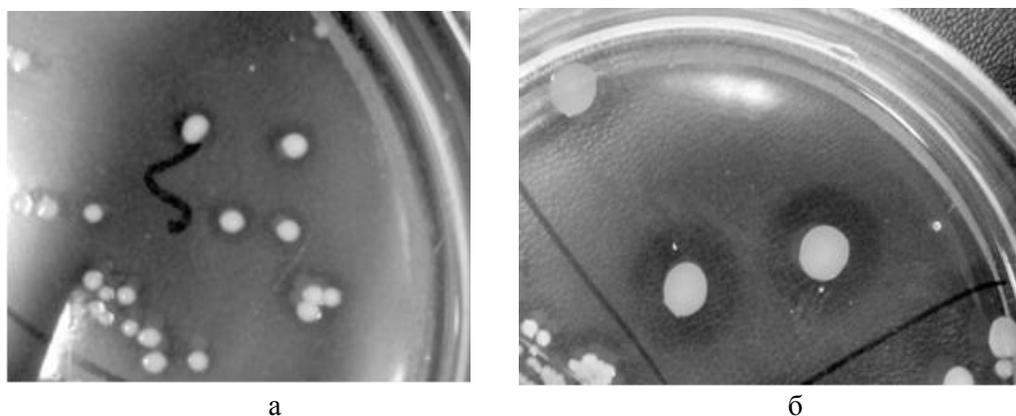


Рис. 3. Зоны гидролизованного хитина (темные ореолы) вокруг колоний микроорганизмов, выделенных из пробы грунта на СПА. а – 7-е сутки после начала культивирования, б – 14-е сутки.

В результате мы обнаружили, что расщепление хитина может осуществляться с помощью микроорганизмов, обитающих в грунте Баренцева моря. Масса хитина снижалась на 13-70 % (в среднем ок. 45 %) за 45 суток инкубации при комнатной температуре (22 °С). Столь значительные колебания обусловлены, по-видимому, особенностями микрофлоры той или иной литеральной зоны. На данном этапе исследований мы хотели установить лишь порядок значений, поэтому для простоты восприятия принимаем, что за 1 сутки утилизируется примерно 1 % биомассы хитина при температуре 22 °С.

Среднегодовая температура воды в придонном слое Баренцева моря колеблется в пределах 0-4 °С. Следовательно, по правилу Вант-Гоффа интенсивность любого ферментативного процесса, в т.ч. распада хитина, будет меньше в 4-8 раз. Следовательно, мы можем предположить, что если количество сброшенного хитина в Баренцевом море не превышает десятикратно его естественное содержание, то весь хитин будет утилизирован в течение примерно 400-800 суток. Это при условии, что видовой и численный состав микрофлоры сохраняется, но есть основания предполагать, что избыток субстрата спровоцирует рост количества хитиновых бактерий.

Итак, мы считаем, что вышеприведенными фактами и расчетами актуальность нашего исследования доказана. Однако настоящим сообщением мы пытаемся лишь заострить биохимический аспект проблемы.

Тем не менее, некоторые выводы очевидны.

Вселение крабов (внесение значительного количества хитина) в холодное Баренцево море вызывает существенные биохимические изменения. В частности, для бентали всего Баренцева моря это означает увеличение биомассы хитина примерно в 2 раза. В районах, в которых образуются

промысловые скопления камчатского краба и ведется его активный промысел и переработка, масса хитина увеличивается в десятки раз.

Система Баренцева моря способна очень медленно утилизировать хитин. Следовательно, есть опасность накопления значительных объемов этого вещества на грунте Баренцева моря, что может повлечь за собой кардинальные изменения в бентосных сообществах и далее во всех биотопах Баренцева моря.

При интенсивном ответе системы (резком увеличении биомассы хитиной бактерий) возможны негативные последствия в виде всплесков бактериальных заболеваний ракообразных, что также влечет за собой существенные экологические изменения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Баканев, С.В., Павлов В.А. О моделировании динамики численности краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*) в Баренцевом море // Вопросы рыболовства. 2010. Т. 11. № 3 (43). С. 485-496.
2. Дробышева С.С. Эвфаузииды Баренцева моря и их роль в формировании промысловой рыбопродукции. Мурманск: Изд-во ПИНРО, 1994. 139 с.
3. Жизнь и условия ее существования в пелагиале Баренцева моря / Гл. ред. Г.Г. Матишов. Апатиты: Кольский филиал АН СССР, 1985. 220 с.
4. Новиков В.Ю., Мухин В.А., Рысакова К.С. Свойства хитинолитических ферментов гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 178-183.
5. Рязанова Т.В. Гистопатологические изменения при панцирной болезни у камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (Tilesius, 1815) / Т. В. Рязанова // Биология моря. 2005. Т. 31, № 6. С. 421-428.
6. Рязанова Т.В. Патологические изменения органов и тканей у краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*) на Западно-Камчатском шельфе Охотского моря / Т. В. Рязанова // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-западной части Тихого океана. 2006. Вып. 8. С. 207-216.
7. Стексова В.В. Морфофизиологическое состояние краба-стригуна опилио (*Chionoecetes opilio*; Brachyura: Majidae) в водах Сахалина в связи с патогенетическим воздействием на него некоторых организмов эпibiоза : Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 Южно-Сахалинск, 2003. 24 с.
8. Anisimova N.A., Jørgensen L.L., Lyubin P.A., Manushin I.E.. Benthos. P. 121-159. In: The Barents Sea – Ecosystem, Resources, Management. Half a century of Russian-Norwegian cooperation. Ed. by T. Jakobsen and V. Ozhigin. Tapir Academic Press, Trondheim. 2011. 825 pp.
9. Lightner D. V. Fungal diseases of marine Crustacea // Pathogenesis Invertebr. Microbial Dis. New Jersey. 1981. P. 451-484.
10. Sindermann C.J., Lightner D.V. Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Amsterdam: Elsevier. 1988. 10 pp.

THE ESTIMATION OF ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL REPERCUSSION OF INTRODUCTION OF CRAB *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* IN BARENTS SEA.

Mischenko E.S., Portsel M.N., Novikov V.Yu., Mukhin V.A.

In the study we attempted to evaluate the effect of invasion of large-scale crabs to the Barents Sea in terms of a biochemist. The calculation of changes in the content of chitin in the Barents Sea was carried. Assumptions about the rate and mechanism of the utilization of chitin in the cold waters were made. The possible ecological and biochemical effects of invasion and industrial development of the red king crab in the Barents Sea were described.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТКАНЯХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1792)

М.А. Назарова, О.Б. Васильева, П.О. Рипатти, Н.Н. Немова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

E-mail: vasil@krc.karelia.ru

Гетеротрофы, благодаря питанию, получают из внешней среды необходимые субстраты для окисления и структурные компоненты, участвующие в пластическом обмене. Именно в составе пищи в организм поступают эссенциальные вещества, к которым относятся некоторые жирные кислоты (ЖК). Одним из модельных объектов изучения метаболизма жирных кислот являются рыбы, поскольку в их тканях возможны процессы элонгации и десатурации линолевой и линоленовой кислот с образованием жирных кислот n-3 и n-6 семейств с более длинной углеродной цепью, что служит адаптивным механизмом рыб к недостатку длинноцепочечных полиненасыщенных ЖК в рационе. Жирные кислоты в составе корма, поступают в энтероциты рыб, где либо окисляются, либо эстерифицируются и в составе липопротеинов транспортируются к органам и тканям животных (Oxley et al., 2005). Исходя из вышеизложенного, цель настоящей работы заключалась в сравнении распределения экзогенных ЖК в липидных фракциях органов и тканей радужной форели *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792).

Исследованы три группы рыб (группы №№ 1, 2 и 3), выращенных в одном из форелевых хозяйств республики Карелия с использованием комбикормов различного состава (корма №№ 1, 2 и 3). Проанализирован жирнокислотный состав фосфолипидов (ФЛ), триацилглицеринов (ТАГ) и эфиров холестерина (ЭХС) мышц, печени и внутреннего жира самок радужной форели возраста 1+, а также кормов. Выделение общих липидов (ОЛ) из тканей форели проводили по методу Фолча (Folch et al., 1957), разделение ОЛ на индивидуальные фракции проводили при помощи тонкослойной хроматографии восходящим способом в системе растворителей: петролейный эфир:диэтиловый эфир:уксусная кислота (в соотношении 90:10:1 по объему) при комнатной температуре (Шталь, 1956). Липидные фракции – ФЛ, ТАГ, ЭХС счищали с пластинок и подвергали прямому метилированию (Цыганов, 1971). Полученные метиловые эфиры жирных кислот разделяли на хроматографе «Кристалл 5000» («Хроматек», Йошкар-Ола). Идентификацию жирных кислот проводили сопоставлением времени выхода пиков экспериментального образца и метчиков, а так же путем расчета эквивалента длины цепи (ЭДЦ) и сравнением его с табличными данными (Jamieson, 1975), количественный анализ осуществляли при помощи компьютерной программы «Программа подсчета хроматограмм». Полученные данные представлены в виде средних значений. Сравнение двух выборок проводили при помощи критерия Вилкоксона – Манна – Уитни, различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Степень воздействия комбикормов на ЖК состав тканей рыб оценивали с использованием дисперсионного анализа.

В результате проведенных исследований установлено как сходство, так и различие в жирнокислотном составе исследованных комбикормов. Для всех изученных кормов характерно преобладание моноеновых ЖК в ТАГ; в составе моноеновых кислот во всех рассмотренных фракциях комбикормов доминировала олеиновая кислота, а среди насыщенных – пальмитиновая. В ФЛ преобладали полиеновые ЖК (табл. 1, 2 и 3). Для комбикорма № 1, в отличие от других кормов, характерно преобладание незаменимой линолевой кислоты 18:2(n-6) (табл. 1 и 2). Корм № 2 отличался высоким уровнем докозагексаеновой кислоты 22:6(n-3), содержание которой в ФЛ достигало 16 % от суммы ЖК. В комбикорме № 3, по сравнению с другими кормами, установлен достаточно высокий уровень кислоты 16:4(n-1) и низкий – 22:1(n-9) во всех исследованных фракциях липидов.

При анализе влияния состава корма на уровень жирных кислот установлено, что трофический фактор не оказал достоверного воздействия на содержание насыщенных жирных кислот практически во всех исследованных фракциях мышц, печени и внутреннего жира радужной форели. Данное обстоятельство может быть связано как с преимущественным окислением насыщенных ЖК в тканях рыб, так и с их синтезом de-novo (Tocher, 2003).

Степень влияния трофического фактора на содержание моноеновых ЖК (МЖК) в ТАГ мышц и внутреннего жира радужной форели составила более 80 %. Уровень МЖК в ТАГ и

ЭХС во всех исследованных органах и тканях рыб был выше их содержания в фосфолипидной фракции. Данные различия могут быть обусловлены функциональными особенностями не только мышц и внутреннего жира, как депонирующих тканей, но и липидных фракций, поскольку ФЛ относятся к структурным веществам клеток, а ТАГ и ЭХС – к запасным.

Таблица 1. Содержание жирных кислот в фосфолипидах (в % от суммы ЖК)

| | мышцы | | | внутренний жир | | | печень | | | корм | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|------|------|
| | №№ групп рыб | | | | | | | | | №№ кормов | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 14:0 миристиновая | 2,4 | 2,8 | 3,0 ^c | 2,8 ^a | 4,3 ^b | 7,2 ^c | 1,9 | 2,2 ^b | 2,6 ^c | 3,4 | 3,5 | 5,6 |
| 16:0 пальмитиновая | 21,3 | 21,2 | 22,8 | 20,1 | 18,9 ^b | 21,7 | 22,1 | 21,4 | 23,5 | 23,2 | 23,4 | 24,1 |
| 18:0 стеариновая | 6,5 ^a | 5,6 | 5,2 ^c | 6,4 | 5,1 | 4,6 ^c | 13,2 | 13,0 ^b | 8,9 ^c | 5,0 | 4,9 | 5,0 |
| ∑ насыщенных кислот | 30,2 | 31,1 | 32,6 ^c | 31,2 | 31,2 ^b | 35,8 ^c | 37,9 | 37,1 | 37,1 | 30,4 | 30,9 | 33,8 |
| 18:1(n-9) олеиновая | 20,1 ^a | 12,4 ^b | 15,2 ^c | 23,7 | 24,2 | 23,0 | 21,1 ^a | 18,4 | 17,4 ^c | 22,1 | 16,8 | 16,1 |
| 22:1(n-9) эруковая | 1,3 | 1,2 ^b | 0,4 ^c | 3,0 | 3,5 ^b | 0,4 ^c | 1,0 | 1,4 ^b | 0,3 ^c | 3,0 | 3,5 | 0,4 |
| ∑ моноеновых кислот | 33,2 | 33,0 ^b | 29,3 ^c | 41,3 | 44,8 ^b | 40,7 | 35,0 ^a | 40,3 ^b | 28,4 ^c | 39,1 | 33,3 | 30,2 |
| 18:2(n-6) линолевая | 8,2 ^a | 3,9 | 4,2 ^c | 6,0 | 6,7 | 6,5 | 8,0 ^a | 3,7 | 4,5 ^c | 17 | 6,5 | 9,4 |
| 20:4(n-6) арахидоновая | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 0,9 | 0,7 | 0,5 | 1,5 | 1,1 ^b | 2,4 ^c | 0,8 | 0,8 | 0,9 |
| ∑ n-6 ПНЖК | 12,1 ^a | 6,3 | 6,7 ^c | 9,4 | 10,4 | 8,9 | 13,2 ^a | 5,4 ^b | 9,7 ^c | 19,2 | 9,4 | 12,3 |
| 18:3(n-3) линоленовая | 1,2 | 0,9 | 1,2 | 0,8 | 0,7 ^b | 1,4 | 0,6 ^a | 0,2 ^b | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 1,8 |
| 20:5(n-3) эйкозапентаеновая | 5,6 ^a | 7,3 ^b | 11,3 ^c | 6,9 ^a | 4,0 | 4,1 ^c | 1,4 ^a | 4,5 | 5,2 ^c | 2,8 | 5,2 | 10,4 |
| 22:6(n-3) докозагексаеновая | 11,3 ^a | 16,1 | 15,7 ^c | 3,2 ^a | 5,5 ^b | 3,1 | 8,2 ^a | 11,4 ^b | 16,1 ^c | 4,2 | 15,9 | 5,1 |
| ∑ n-3 ПНЖК | 21,2 ^a | 26,5 | 25,3 ^c | 14,9 | 14,1 | 11,4 | 12,5 ^a | 17,2 ^b | 23,6 ^c | 9,8 | 24,2 | 19,6 |
| 16:4(n-1) | 0,1 | 0,1 ^b | 0,5 ^c | 0,1 | 0,2 ^b | 0,5 ^c | 0,04 | 0,04 ^b | 0,3 ^c | 0,1 | 0,1 | 1,5 |
| ∑ ПНЖК | 36,6 | 35,9 ^b | 38,1 | 27,5 | 24,0 | 21,5 ^c | 27,1 | 22,6 ^b | 34,5 | 30,5 | 35,8 | 36,0 |

Примечание: а – различия достоверны при сравнении 1 и 2 групп рыб при $p \leq 0,05$; б – различия достоверны при сравнении 2 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$; с – различия достоверны при сравнении 1 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$

Интересно проанализировать распределение нехарактерной для тканей лососевых эруковой кислоты 22:1(n-9), значительное содержание которой в корме № 1 и № 2 свидетельствует об использовании рапсового масла при его производстве (Sahasrabudhe, 1977). Высокий уровень эруковой кислоты 22:1(n-9) в ФЛ, ТАГ и ЭХС кормов № 1 и № 2 отразился на значительном содержании данной кислоты в соответствующих фракциях тканей рыб групп № 1 и № 2 (табл. 1, 2 и 3); и если в ТАГ и ЭХС мышц и внутреннего жира форели процент данной кислоты примерно одинаков, то в ФЛ мышц ее уровень достоверно ниже, чем в ФЛ внутреннего жира. Возможно, это связано с функциональными особенностями тканей, так внутренний жир по сравнению с мышцами имеет большее значение как депонирующая ткань, и именно там в первую очередь запасаются пищевые ЖК.

Уровень эссенциальных жирных кислот – линолевой 18:2(n-6) и линоленовой 18:3(n-3) в ФЛ мышц, внутреннего жира и печени форели практически не определялось содержанием данных ЖК в кормах. При этом, не смотря на значительные отличия в содержании линолевой кислоты в ФЛ исследованных комбикормов, ее уровень в данной фракции тканей различных групп рыб оказался менее вариабельным (табл. 1).

Содержание физиологически важных жирных кислот – эйкозапентаеновой 20:5(n-3) и докозагексаеновой кислот 22:6(n-3) в ФЛ тканей рыб не зависело от состава комбикормов. Стабильность жирнокислотного состава ФЛ при влиянии трофического фактора, вероятно,

имеет особое значение, поскольку ФЛ являются основными структурными компонентами клетки и изменение соотношения ЖК в них происходит под действием других факторов, например, температуры (Смирнов, Богдан, 2007; Wallaert, Babin, 1997).

Таблица 2. Содержание жирных кислот в триацилглицеринах (в % от суммы ЖК)

| | мышцы | | | внутренний жир | | | печень | | | корм | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|------|------|
| | №№ групп рыб | | | | | | | | | №№ кормов | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 14:0 миристиновая | 3,6 ^a | 4,9 ^b | 5,4 ^c | 3,7 | 5,0 | 5,5 ^c | 2,3 | 2,9 ^b | 5,0 ^c | 4,1 | 6,8 | 5,9 |
| 16:0 пальмитиновая | 16,2 | 16,8 | 17,6 | 15,4 | 16,5 | 16,8 | 14,4 | 14,9 ^b | 29,5 ^c | 14,3 | 17,3 | 22,0 |
| 18:0 стеариновая | 3,8 | 3,7 | 4,0 | 3,7 | 3,7 | 3,4 | 5,0 | 4,7 | 5,0 | 3,8 | 3,3 | 3,7 |
| ∑ насыщенных кислот | 24,4 | 26,1 | 29,6 ^c | 24,2 | 25,8 | 29,1 ^c | 22,0 | 23,4 ^b | 31,7 ^c | 23,4 | 29,1 | 33,8 |
| 18:1(n-9) олеиновая | 28,4 ^a | 23,8 | 24,1 ^c | 30,1 ^a | 25,6 | 25,1 ^c | 36,2 ^a | 32,6 ^b | 22,4 ^c | 25,5 | 24,3 | 22,1 |
| 22:1(n-9) эруковая | 2,6 ^a | 4,4 ^b | 1,0 ^c | 2,6 ^a | 4,3 ^b | 1,0 ^c | 1,3 ^a | 2,7 ^b | 1,0 | 6,0 | 8,9 | 1,1 |
| ∑ моноеновых кислот | 43,8 ^a | 41,2 ^b | 40,1 ^c | 46,2 ^a | 47,9 ^b | 43,8 ^c | 54,2 | 56,6 ^b | 38,1 ^c | 44,4 | 41,3 | 35,6 |
| 18:2(n-6) линолевая | 16,2 ^a | 8,3 | 8,4 ^c | 15,8 ^a | 8,5 | 7,9 ^c | 8,6 ^a | 3,1 ^b | 6,5 ^c | 18,5 | 4,0 | 8,9 |
| 20:4(n-6) арахидоновая | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 ^b | 0,8 ^c | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| ∑ n-6 ПНЖК | 18,4 ^a | 9,9 ^b | 11,2 ^c | 18,1 ^a | 10,2 | 9,5 ^c | 11,4 ^a | 5,4 ^b | 9,8 ^c | 20,1 | 5,3 | 10,3 |
| 18:3(n-3) линоленовая | 2,4 ^a | 1,9 | 2,1 | 2,3 ^a | 1,8 | 1,9 | 0,9 | 0,5 ^b | 1,5 | 3,0 | 1,3 | 1,9 |
| 20:5(n-3) эйкозапентаеновая | 3,9 ^a | 6,0 | 5,8 ^c | 3,8 ^a | 2,3 ^b | 5,2 ^c | 7,2 ^a | 4,7 | 4,4 ^c | 4,4 | 7,9 | 7,7 |
| 22:6(n-3) докозагексаеновая | 3,7 ^a | 5,9 | 5,2 ^c | 3,1 ^a | 5,6 ^b | 4,3 ^c | 2,4 ^a | 5,1 ^b | 8,3 ^c | 3,3 | 8,1 | 3,6 |
| ∑ n-3 ПНЖК | 12,2 ^a | 18,0 ^b | 16,1 ^c | 11,4 ^a | 13,2 | 14,4 ^c | 12,5 | 13,1 ^b | 17,1 ^c | 12,4 | 22,5 | 16,1 |
| 16:4(n-1) | 0,1 | 0,2 ^b | 0,4 ^c | 0,1 | 0,2 ^b | 0,5 ^c | 0,02 | 0,04 ^b | 0,4 ^c | 0,1 | 0,2 | 1,2 |
| ∑ ПНЖК | 31,8 | 32,7 ^b | 30,3 | 29,6 ^a | 26,3 | 27,1 ^c | 23,8 ^a | 20,0 ^b | 30,2 ^c | 32,2 | 29,6 | 30,6 |

Примечание: а – различия достоверны при сравнении 1 и 2 групп рыб при $p \leq 0,05$; b – различия достоверны при сравнении 2 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$; c – различия достоверны при сравнении 1 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$

Таблица 3. Содержание жирных кислот в эфирах холестерина (в % от суммы ЖК)

| | мышцы | | | внутренний жир | | | печень | | | корм | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|------|------|
| | №№ групп рыб | | | | | | | | | №№ кормов | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 14:0 миристиновая | 3,3 | 3,4 ^b | 4,0 ^c | 2,9 | 2,2 ^b | 4,5 ^c | 2,9 | 3,3 ^b | 5,7 ^c | 3,1 | 3,6 | 6,3 |
| 16:0 пальмитиновая | 17,1 ^a | 14,2 ^b | 17,7 | 16,2 ^a | 14,4 ^b | 19,6 ^c | 16,1 | 15,4 ^b | 19,7 ^c | 17,3 | 15,1 | 21,0 |
| 18:0 стеариновая | 1,3 ^a | 3,6 | 4,2 ^c | 5,3 | 4,8 ^b | 6,0 | 4,9 ^a | 1,9 ^b | 5,2 | 3,2 | 2,9 | 1,1 |
| ∑ насыщенных кислот | 28,1 ^a | 23,3 ^b | 27,8 | 26,2 ^a | 23,4 ^b | 33,8 ^c | 26,1 ^a | 29,8 ^b | 35,1 ^c | 33,2 | 32,1 | 34,8 |
| 18:1(n-9) олеиновая | 20,1 | 20,9 ^b | 19,1 | 27,1 ^a | 20,4 ^b | 19,4 ^c | 25,1 ^a | 17,7 ^b | 23,2 | 18,2 | 17,9 | 17,3 |
| 22:1(n-9) эруковая | 2,4 | 2,6 ^b | 0,9 ^c | 2,4 | 2,0 | 1,9 ^c | 2,2 | 2,7 ^b | 0,8 ^c | 3,2 | 3,6 | 0,5 |
| ∑ моноеновых кислот | 41,2 ^a | 54,8 ^b | 38,0 ^c | 44,4 ^a | 50,1 ^b | 36,3 ^c | 40,6 ^a | 35,4 ^b | 41,2 | 35,7 | 37,7 | 32,1 |
| 18:2(n-6) линолевая | 9,0 ^a | 7,2 | 6,3 ^c | 11,2 ^a | 6,6 | 5,4 ^c | 11,9 ^a | 6,2 ^b | 8,6 ^c | 12,1 | 3,6 | 6,4 |
| 20:4(n-6) арахидоновая | 0,8 ^a | 0,2 ^b | 0,5 | 0,6 ^a | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 0,6 | 0,5 ^c | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| ∑ n-6 ПНЖК | 13,0 ^a | 11,4 ^b | 8,7 ^c | 15,1 ^a | 12,2 ^b | 9,5 ^c | 15,6 ^a | 12,2 ^b | 9,9 ^c | 15,1 | 7,2 | 8,8 |
| 18:3(n-3) линоленовая | 0,7 ^a | 1,5 ^b | 2,2 ^c | 1,5 | 1,4 | 1,4 | 0,8 | 0,9 ^b | 1,8 ^c | 1,1 | 1,2 | 1,8 |
| 20:5(n-3) эйкозапентаеновая | 1,8 | 1,9 ^b | 8,4 ^c | 2,1 | 2,6 ^b | 5,9 ^c | 2,1 ^a | 13,2 ^b | 3,2 | 2,1 | 8,1 | 9,6 |
| 22:6(n-3) докозагексаеновая | 5,2 ^a | 2,9 ^b | 8,7 ^c | 3,5 | 3,5 ^b | 5,2 ^c | 6,9 ^a | 2,2 | 3,7 ^c | 3,5 | 7,9 | 4,7 |
| ∑ n-3 ПНЖК | 13,2 ^a | 8,8 ^b | 22,0 ^c | 9,7 ^a | 11,4 ^b | 17,6 ^c | 14,3 ^a | 19,2 ^b | 12,8 ^c | 14,1 | 20,2 | 19,1 |
| 16:4(n-1) | 0,2 | 0,1 ^b | 0,3 | 0,2 | 0,1 ^b | 0,4 ^c | 0,1 | 0,1 ^b | 0,4 ^c | 0,1 | 0,1 | 1,3 |
| ∑ ПНЖК | 30,7 ^a | 21,9 ^b | 34,2 ^c | 29,4 ^a | 26,5 ^b | 29,9 ^c | 33,3 | 34,8 ^b | 23,7 ^c | 31,1 | 30,2 | 33,1 |

Примечание: а – различия достоверны при сравнении 1 и 2 групп рыб при $p \leq 0,05$; b – различия достоверны при сравнении 2 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$; c – различия достоверны при сравнении 1 и 3 групп рыб при $p \leq 0,05$

Основное различие в уровне полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) между группами рыб, обнаружено в ТАГ внутреннего жира и мышц форели (табл. 2). Степень влияния трофического фактора на содержание линолевой и линоленовой кислот соответственно составила 73 % и 59 % в мышцах и 68 % и 65 % во внутреннем жире. Воздействие состава корма на уровень данных кислот в печени не установлено, что, вероятно, обусловлено функциональными особенностями печени, как основного органа метаболизма у радужной форели.

Степень влияния трофического фактора на уровни эйкозапентаеновой 20:5(n-3) и докозагексаеновой 22:6(n-3) кислот в ТАГ и ЭХС составляла 60 – 68 % в мышцах и внутреннем жире радужной форели ($p \leq 0,05$). Именно в составе ТАГ и ЭХС жирные кислоты депонируются ЖК в тканях рыб.

Достаточно высокая степень воздействия состава корма (около 60 %) установлена на уровень 16:4(n-1) кислоты во всех исследованных фракциях мышц, печени и внутреннего жира. В корме № 3 содержание данной кислоты в 13 раз выше, чем в комбикормах № 1 и № 2 и составляло около 1,3 % от суммы жирных кислот, что отразилось на процентном распределении ЖК в тканях рыб. Уровень 16:4(n-1) кислоты в ТАГ рыб группы № 3 в десять раз выше содержания данной кислоты в ТАГ рыб других групп. Именно для таких кислот, которые нехарактерны для тканей радужной форели, наиболее четко прослеживается влияние трофического фактора.

Таким образом, наименьшая вариабельность жирнокислотного состава показана для фосфолипидов всех исследованных тканей рыб. Содержание ЖК данной липидной фракции не зависит от состава комбикорма, что отражает адаптивные возможности организма при поступлении экзогенных липидов, направленные на поддержание оптимального соотношения ЖК в ФЛ тканей рыб. Содержание МЖК и ПНЖК в составе ТАГ и ЭХС, напротив, в основном, определяется составом корма. Печень радужной форели служит основным органом синтеза и ресинтеза веществ и ее ЖК состав практически не зависит от трофического фактора. Соотношение ЖК в мышцах и внутреннем жире рыб, в основном, определяется составом комбикормов, поскольку данные ткани у радужной форели являются депонирующими.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 11-04-00167-а и программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ № 1642.2012.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого – биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды М.: Наука., 2007. 182 с.
2. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях М.: Мир., 1965. 508 с.
3. Цыганов Э.П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля / Э.П. Цыганов // Лабораторное дело. 1971. № 8. С. 490–493.
4. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497-509.
5. Jamieson G.R. GLS–identification techniques for longchain unsaturated fatty acids / G.R. Jamieson // J. Chromatogr.Sci. 1975. V. 13. № 10. P.491–497.
6. Oxley A. Fatty acid utilisation and metabolism in caecal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary fish or copepod oil / A. Oxley, D.R. Tocher, B.E. Torstensen, R.E. Olsen // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2005. V. 1737. № 2-3. P. 119–129.
7. Sahasrabudhe M. R. Crismer values and erucic acid contents of rapeseed oils / M. R.Sahasrabudhe // Journal of the American Oil Chemists' Society. 1977. V. 54. № 8. P. 32 –324.
8. Tocher D.R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish / D.R. Tocher // Reviews in Fisheries Science. 2003. V. 11. № 2. P. 107–184.
9. Wallaert C. Circannual variation in the fatty acid composition of high-density lipoprotein phospholipids during acclimatization in trout / Wallaert C., Babin P.J. // Biochim Biophys Acta. – 1993. V.1210(1). №2. P. 3–29.

DISTRIBUTION EXOGENOUS FATTY ACIDS IN THE TISSUES OF RAINBOW TROUT *PARASALMO MYKISS* (WALBAUM, 1792)

M.A. Nazarova, O.B. Vasiljeva, P.O Ripatty, N.N. Nemova
*Institute of Biology of the Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS),
Petrozavodsk, Russia
E-mail: vasil@krc.karelia.ru*

Fatty acid composition (FA) was analyzed in phospholipids, triacylglycerides, cholesterol esters in of muscle, liver and fat of rainbow trout. The level of the FA depends on the ratio of tissue fatty acids in the feed.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПИЩЕВЫХ АДАПТАЦИЙ РЫБ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

И.Н. Остроумова

Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства (ФГБНУ «ГосНИОРХ»), Санкт-Петербург, Россия, e-mail: IrinaOstroum@yandex.ru

Важнейшим условием нормального роста молоди рыб в условиях аквакультуры является обеспечение ее адекватным питанием. Поэтому с развитием рыбоводства приоритетным становится изучение физиологических потребностей молоди в качественном составе пищи, в соотношении конкретных питательных веществ рациона (белков, липидов, углеводов, витаминов, минеральных элементов) с учетом его энергетической ценности. Эти направления исследований позволили раскрыть новые, ранее не известные, особенности физиологии и биохимии питания рыб, а так же биохимического состава кормовых беспозвоночных. Особенно это касается адаптационных механизмов раннего онтогенеза в период перехода личинок на внешнее питание, когда пищеварительная функция находится еще в стадии становления.

По результатам исследований многих авторов (Остроумова, 2005), изучавших личинок весенне-нерестующих пресноводных и морских рыб, потребление пищи начинается у них очень рано: желудок еще не сформирован, в пищеварительной полости отсутствует кислая среда, не закончено развитие поджелудочной железы, активность протеолитических ферментов в кишечнике иногда близка к нулю, а увеличение белка в рационе не вызывает еще повышение активности трипсина в полости. Процесс формирования пищеварительной системы у питающихся уже личинок разных видов рыб продолжается от нескольких дней до нескольких недель. Особенно длителен он у морских пелагических рыб - 30 и более суток.

Отметим, что, несмотря на такое состояние пищеварительного тракта, ранняя молодь в это время обладает чрезвычайно активным ростом, не сопоставимым по скорости с последующими периодами жизни. Например, суточный прирост личинок карпа при высоких, оптимальных для них температурах (28-30°) может достигать 100% и выше. Не менее высокую скорость роста развивает молодь и многих других пресноводных и морских весенне-нерестующих рыб с мелкой икрой. Такая скорость необходима для личинок с начальной массой от 0,1-0,5 мг до нескольких мг, чтобы к концу первого вегетационного сезона достичь нескольких граммов или несколько десятков граммов, т.е. увеличить свою массу в несколько тысяч или десятков тысяч раз.

Очевидно, что для осуществления такого интенсивного роста при слабом развитии пищеварительной системы необходимо поступление большого количества легко усвояемых питательных веществ.

При исследовании биохимического состава мелких форм зоопланктона (клядоцеры, копеподы, коловратки), которыми питается ранняя молодь, выяснилось, что они характеризуется особым составом, принципиально отличающимся от привычного биохимического состава крупных животных организмов. Оказалось, что 50-70% белка мелкого зоопланктона находится в растворимой форме, причем большая часть его присутствует в виде продуктов белкового обмена - **низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот**. При этом в пресноводном планктоне преобладают короткие пептиды при небольшом количестве свободных аминокислот, в то время как в морском - уровень свободных аминокислот обычно значительно выше. Такой состав белкового материала не требует мощной ферментативной обработки, что объясняет казалась бы парадоксальную вещь – интенсивный белковый рост питающихся личинок при почти полном отсутствии полостного пищеварения.

Необходимость включения в состав начальной пищи личинок карпа диспергированного белкового материала, установленная исследованиями ГосНИОРХа в 70-е г.г., была подтверждена многими авторами, в том числе и зарубежными, на разных видах рыб путем введения в состав стартовых кормов ферментализатов и гидролизатов кормовых компонентов, и широко использовалась в практике рыбоводства при кормлении ранней молоди рыб (Остроумова, 2012).

По современным представлениям ранняя молодь обладает принципиально другими механизмами переваривания поступающей пищи, чем рыбы старших возрастов. При отсутствии или слабом функционировании полостного пищеварения усвоение питательных веществ

происходит путем внутриклеточного и мембранного переваривания (Govoni et al., 1986, Кузьмина, 2005, Немова, Высоцкая, 2004). Причем процесс этот характеризуется высокой эффективностью, если учесть тот большой объем питательных веществ, который нужно усвоить для чрезвычайно интенсивного роста.

В ходе изучения биохимического состава естественной пищи и физиологии питания молоди в условиях аквакультуры были вскрыты еще ряд характерных особенностей раннего онтогенеза, существенно отличающихся от особенностей других этапов жизненного цикла рыб.

Еще в работах 90-х годов в нашей лаборатории было обнаружено, что мелкий зоопланктон характеризуется очень высоким содержанием **нуклеиновых кислот**, достигающим 10-12% сухого вещества, причем около трети их было представлено мелкими структурами нуклеинового обмена. Сопоставимое с этим количество нуклеиновых кислот (7-9% сух. в-ва) содержали и личинки разных видов рыб, что свидетельствовало о высокой скорости их роста. С возрастом и снижением роста уменьшалось и количество нуклеиновых кислот в тканях рыб.

Известно, что в организме животных значительная часть азотистых оснований, образовавшихся после распада нуклеотидов, снова участвуют при белковом росте в синтезе нуклеиновых кислот в качестве блоков, что обеспечивает высокую скорость этим процессам. Поскольку все позвоночные животные способны синтезировать нуклеиновые кислоты в необходимых количествах, они не считаются незаменимыми в их питании. Но в исследованиях последнего времени, в частности на рыбах, было установлено, что включение в состав кормов для молоди низкомолекулярных продуктов нуклеинового обмена повышает активность иммунной системы и благоприятно сказывается на росте молоди (Li, Gatlin III, 2006). Использование промежуточных продуктов нуклеинового обмена, в частности, инозина, азотистых оснований, стимулировало выработку антител, ускоряло рост и повышало жизнестойкость рыб. Так как исследования в этом направлении находятся еще на начальной стадии, авторы считают возможным отнести нуклеотиды к условно-незаменимым факторам питания молоди.

Таким образом, в естественных условиях личинки рыб адаптированы к поступлению с пищей большого количества легко усвояемых веществ не только белкового, но и нуклеинового обмена.

Мелкий зоопланктон отличается особым составом липидов. Он содержит большое количество **фосфолипидов**, которое часто превышает содержание резервных жиров – триацилглицеринов, достигая 57-63, а порой и 70% от всех липидов (Van der Meeren et al., 2008). К этому хорошо адаптированы начинающие питаться личинки. Фосфолипиды играют у них не только пластическую роль, входя в состав клеточных мембран, но и являются поставщиками энергии. Кроме того, они лучше усваиваются на ранних стадиях развития, чем резервные жиры.

Если незаменимыми среди липидных структур для рыб в течение всей жизни являются высоконасыщенные жирные кислоты семейства ω 3 и, в меньшей степени, ω 6, то на ранних личиночных стадиях по современным представлениям незаменимыми становятся и более сложные структуры - фосфолипиды, богатые эссенциальными жирными кислотами (Tocher et al., 2008). В тоже время на последующих этапах жизненного цикла при достаточном содержании незаменимых жирных кислот фосфолипиды синтезируются в организме рыб в необходимых количествах и специального поступления их с пищей обычно не требуется. Характерно, что липиды тела личинок характеризуются иным составом, чем жиры старших возрастов. До 50% липидов ранней молоди представлено фосфолипидами, содержание которых по мере роста существенно снижается, а резервных жиров – увеличивается. Специальная добавка фосфолипидов в рационы молоди многих видов рыб давала положительные результаты в основном на ранних этапах в периоды наиболее интенсивного роста (повышался рост, жизнестойкость рыб). У молоди массой нескольких граммов эффект добавления фосфолипидов уже не проявлялся.

По поводу функции фосфолипидов, которая делает их незаменимыми в питании личинок, мнения противоречивы. Среди многих функций приоритет в последнее время отдается транспортной (Tocher et al., 2008). Входя в состав липопротеинов, фосфолипиды у животных активно участвуют в распространении жиров по организму. На ранних стадиях развития рыб

способность транспорта липидов ограничена. Присутствие достаточного количества фосфолипидов в корме позволяет обеспечивать быструю доставку поступивших с пищей жирных кислот и нейтральных липидов из клеток кишечника к органам и тканям стремительно растущего организма. Их дефицит приводит к скоплению жировых выделений в клетках кишечника, т.е. к задержке дальнейшей утилизации абсорбированных липидов.

Содержание **витаминов** в зоопланктоне сильно варьирует, в зависимости от питания и других факторов. В благоприятной среде мелкий зоопланктон с высоким уровнем обмена обычно богат многими витаминами (особенно морской), что создает комфортные условия для потребляющих его личинок, обеспечивая им быстрый рост, нормальное развитие, высокую жизнестойкость.

Установлено, что у зоопланктонных организмов отсутствует способность синтеза аскорбиновой кислоты (Mitra et al., 2007, Van der Meeren et al., 2008) и поэтому содержание ее у них сильно колеблется в зависимости от ее уровня в фитопланктоне. В обследованном авторами пресноводном планктоне уровень витамина С составлял только 15-39 мкг/г сух. в-ва, т.е. меньше, чем требовалось молодым рыбам. В то же время у морского зоопланктона содержание витамина С при сильном колебании (271-553) достигало иногда очень высоких значений 1232 мкг/г сух. в-ва.

Интересная особенность установлена для личинок карпа (Dabrowski et al., 1988). В отличие от многих других видов рыб карпы способны синтезировать витамин С в необходимых количествах и мало чувствительны к его дефициту в пище. Но, как выяснилось, эта способность развивается только с возрастом. На ранних же этапах молодь карпа должна получать аскорбиновую кислоту. Отсутствие ее в рационе уже через несколько дней после начала питания вызывает эррозию плавников, деформацию жабр. При этом содержание витамина С в тканях личинок падает до 16,6-36,9 мкг/г сырого вещества против 101,1 у молодой, не испытывающей дефицита витамина.

Мелкий зоопланктон богат **каротиноидами**, особенно астаксантином, но беден важнейшим для роста витамином А. Это особенно характерно для морских гидробионтов. Источником этого витамина служат его предшественники – каротиноиды, которые содержатся в большом количестве у водных беспозвоночных. Очень богаты астаксантином ракообразные, например, науплии морских копепод отличаются обилием этого каротиноида (413-1422 мкг/г сух. в-ва) при почти полном отсутствии витамина А (Van der Meeren et al., 2008).

Минеральное питание ранней молодью рыб изучено крайне слабо. Макро- и микроэлементы она получает как из пищи, так и из воды, если они там присутствуют. В условиях аквакультуры часто проблемы возникают с таким важнейшим для формирования скелета элементом как фосфор. Даже старшие возрастные группы рыб испытывают затруднение с извлечением его из животных и растительных компонентов, входящих в состав кормов. В воде же концентрация фосфора минимальна. Очевидно, что в естественной пище личинок этот элемент находится в легко усвояемой доступной форме.

В заключение отметим, что показателем адаптации многих весенне-нерестующих рыб к уникальным особенностям биохимического состава зоопланктона (большое количество низкомолекулярных продуктов белкового и нуклеинового обмена, обилие высоконасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, каротиноидов, многих витаминов) является, возникший у них в результате эволюции, ранний переход к внешнему питанию при слабо развитой еще пищеварительной функции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М., Наука, 2005. 300 с.
2. Немова Н.Н., Высоцкая Р.У. Биохимическая индикация состояния рыб. М., Наука, 2004. 215 с.
3. Остроумова И.Н. Проблема стартовых кормов и физиологические аспекты кормления личинок рыб// Сб. науч. трудов ГосНИОРХ. 2005. Вып. 333. С. 207–259.
4. Остроумова И.Н. Биологические основы кормления рыб. Изд.2, ГосНИОРХ, 2012. 566с.
5. Dabrowski K., Hinterleitner S., Sturmhuber C., El-Fiky N., Wieser W. Do carp larvae require vitamin C? // Aquaculture. 1988. V.72. P. 295-306.
6. Govoni J.J., Bochiert G.W., Watanabe Y. The physiology of digestion in fish larvae. -Environmental Biology of Fishes// 1986. V.16. № 1-3. P. 59-77.

7. Li P., Gatlin III D.M. Review article. Nucleotide nutrition in fish: current knowledge and future applications// *Aquaculture*. 2006.V. 251. P.141-152.
8. Mitra G., Mukhopadhyay P.K., Ayyappan S. Biochemical composition of zooplankton community grown in freshwater earthen ponds: nutritional implication in nursery rearing of fish larvae and early juveniles// *Aquaculture*. 2007. V. 272. P. 346–360.
9. Tocher D.R., Bendiksen E.A, Campbell E.A., Bell J.G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish// *Aquaculture*. 2008. V. 280. P. 21–34.
10. Van der Meeren T., Olsen R.E., Hamre K., Fyhn H.J. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish// *Aquaculture*. 2008. V. 274. P. 375–397.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF FOOD ADAPTATIONS OF FISH IN THE EARLY ONTOGENESIS

I.N. Ostroumova

Larvae of most spring-spawning fish species with small roe begin to feed under unfinished development of digestive system (they do not still have their stomach, pancreas is inactive, enzymatic activity in the intestinal cavity is feebly marked). Early transition to feeding and effective digestion of large food quantity, the intensive growth of larvae is evidence of that, is possible only in the presence of easily digestible nutrients. The small zooplankton, to consumption of which the fry is adapted, is characterized by the peculiar biochemical composition – high content of soluble protein, low-molecular peptides, free amino acids, small products of nucleic acid metabolism. It is rich in phospholipids, polyunsaturated fatty acids, carotenoids, vitamins and other physiologically active substances.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РЫБ (НА ПРИМЕРЕ СИГОВЫХ ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ)

Пак И. В.

ФГБОУ ВПО «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

E-mail: pakiv57@mail.ru

В настоящей работе приведены результаты комплексного исследования сиговых рыб, обитающих в речных и озерных экосистемах на Севере Тюменской области, проведенного в разные годы.

Материалом исследования были развивающиеся эмбрионы и взрослые особи пеляди *Coregonus peled* (Gmelin), пыжьяна – *C. lavaretus pidschian* (Gmelin), чира – *C. nasus* (Pallas) и муксуна – *C. muksun* (Pallas), ряпушки сибирской *Coregonus sardinella* Val.

Половозрелых рыб отлавливали в районе их нерестилищ, сбор половых продуктов осуществляли от текущих производителей. Свежеотцеженную икру от группы самок осеменяли спермой от нескольких самцов. Отмытую и набухшую оплодотворенную икру инкубировали в аппаратах Вейса. Развивающихся эмбрионов, начиная со стадии поздней бластулы, периодически фиксировали по Карнуа и затем приготавливали давленные препараты по общепринятой ацетокарминовой методике. Состояние генетического гомеостаза рыб оценивали по частоте встречаемости аномальных митозов в клетках развивающихся зародышей и по частоте эмбрионов с видимыми нарушениями развития. Морфометрический анализ провели на рыбах в возрасте 3-х лет, отловленных в р. Пур. Сбор биохимических проб проводили одновременно с морфологическим анализом. Обработывали белые скелетные мышцы, используя метод электрофореза в ПААГ.

Цитогенетический анализ развивающихся эмбрионов сиговых рыб, населяющих водоемы Тюменской области, проведенный в 1989 г., позволил определить генетическое состояние популяций как относительно стабильное. Если частота встречаемости у эмбрионов спонтанных хромосомных нарушений в какой-то мере отражает стабильность и устойчивость развития организмов, то более стабильными выглядели популяции рыб из речных экосистем по сравнению с озерными. На этом фоне исключительное положение занимает чир, интерпретация которого дана в одной из ранее опубликованных работ (Цой и др., 1996; Пак, 2005)).

Повторные исследования популяций из ряда водоемов, проведенные через 7 и затем через 5 лет, выявили негативные изменения в показателях стабильности развития и в условиях озерных, и в

условиях речных экосистем. Так, частота аберрантных клеток у эмбрионов пеляди из оз. Ендырь к 1996 г. повысилась на 157%; а к 2001 г. еще на 14,3%; у эмбрионов пеляди из оз. Челбаш это увеличение к 1996 г. составило 100%. У муксуна из низовья р.Оби частота аберрантных клеток у развивающихся зародышей к 1996 г. возросла на 138,6%, а к 2001 г. еще на 42,3%. У эмбрионов чира из р. Ляпин встречаемость аберрантных клеток, наоборот, к 1996 г. снизилась на 41%, но тем не менее оставалась самой высокой среди всех исследованных видов рыб.

Морфологический анализ популяций сиговых рыб по совокупности пластических и меристических признаков не выявил высоких показателей изменчивости. Более высокие значения коэффициентов вариации были зафиксированы у ряпушки сибирской по массе тела. Ранее отмечалось, что для ряпушки являются характерными резкие колебания по массе тела между особями, что обуславливает большую изменчивость этого вида (Скрябин, 1979).

Биохимический анализ белых скелетных мышц пеляди, пыжьяна, ряпушки сибирской и чира по 20 локусам выявил разный уровень полиморфности и гетерозиготности. Наиболее низкий уровень полиморфности по 99%-ному критерию был обнаружен у ряпушки сибирской (0,105), наиболее высокий – у пыжьяна (0,200). У пеляди и чира этот показатель был одинаков и составил 0,150. Показатели средней на локус гетерозиготности также были размытыми: наиболее высокий отмечен у пыжьяна, наименьший – у пеляди. Сопоставление показателей полиморфности и гетерозиготности у ряпушки сибирской и чира из разных водоемов выявило специфичность популяций из р. Пур. Для ряпушки, обитающей в р. Пур, в сравнении с популяциями из рек Восточной Сибири характерны более низкая полиморфность и низкий показатель гетерозиготности. У чира из р. Пур показатели полиморфности являются промежуточными между гетерозиготностью чира из рек Анадырь и Чаун и чира из реки Енисей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Пак И.В. Комплексная морфогенетическая оценка состояния природных популяций рыб. Тюмень: изд-во ТюмГУ. 2005. 166с.
2. Скрябин А.Г. Сиговые рыбы юга Сибири. Новосибирск: Наука. 1979. 212 с.
3. Цой Р.М., Сергиенко Л.Л., Пак И.В. Хромосомная мутабельность у сиговых рыб из речных и озерных экосистем Обь-Иртышского бассейна// Генетика. 1996. Т.32. № 1. С. 137-139.

AN INTEGRATED APPROACH TO THE ASSESSMENT OF STABILITY OF NATURAL FISH POPULATIONS (BY EXAMPLE OF COREGONIDAE IN TYUMEN REGION)

Pak I.V.

Tyumen State University, Tyumen, Russian Federation

e-mail: pakiv57@mail.ru

The article presents an integrated approach to the assessment of stability of natural populations in changeable environment. It includes an assessment based on cytogenetic, biochemical and morphological indicators.

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ МОРФОЛОГИИ ТЕРМАЛЬНЫХ ВИДОВ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ (СЕМЕЙСТВ LYMNAEIDAE, PLANORBIDAE, THIALRIDAE)

И.С. Пальцер

Институт экологических проблем Севера УрО РАН, Архангельск, Россия

e-mail: ingasevsk@yandex.ru

Горячие источники представляют собой уникальные экологические системы (Хмелева и др., 1985). Гидротермальные системы являются природными термостатами, где температура воды у истоков остается практически постоянной в течение довольно длительных промежутков времени. Отличительной особенностью гидротермальных сообществ моллюсков является определенный набор видов, доминирующих в специфических условиях среды - это брюхоногие легочные моллюски. Фауна моллюсков гидротермальных источников в настоящее время остается недостаточно изученной. Пресноводные моллюски, являясь одним из звеньев термальных водных биоценозов, играют существенную роль в биологических процессах, протекающих в водоемах. Гидротермы с их константным температурным и гидрохимическим режимом представляют собой более благоприятные местообитания по сравнению с

зональными вариантами. В условиях гидротермальной аномалии горячих источников формируются поселения моллюсков со специфическим видовым составом и структурой (Беспалая и др., 2011). У брюхоногих моллюсков выработался и закрепился комплекс физиолого-биохимических адаптаций, позволяющих им успешно обитать в условиях повышенных температур. Среди них значительная инертность интенсивности дыхательных процессов, специфические комплексы некоторых ферментативных систем, увеличение скорости развития и воспроизводства (Хмелева и др., 1985; Березкина, Старобогатов, 1988).

Материалом для работы послужила фондовая коллекция термальных и континентальных моллюсков Зоологического института РАН в г. Санкт-Петербурге - преемника Зоологического музея Императорской академии наук, основанного в 1832 году. Во время обработки проб учитывались численность и морфометрические данные (Круглов, 2005) по трем семействам гастропод (Lymneidae, Planorbidae, Thiaridae). Целью данного анализа было сравнение морфометрических показателей раковин видов, обитающих в термах, и видов, заселяющих континентальные водоемы.

При работе с коллекциями учитывалась информация, указанная на этикетках: номер пробы, сведения о месте сбора, коллекторах, занесенные в систематический каталог фондовой коллекции. За основу исследований были выбраны коллекции Журавского А.В., Жадина В.И., Иззатуллаева З.И. и др. При обработке материала использовался бинокулярный микроскоп МБС-10. Всего было промерено более 900 экземпляров моллюсков.

Морфологические особенности популяций моллюсков горячих источников прослеживаются и в размерных характеристиках раковин. Лимнеиды характеризуются значительной морфологической изменчивостью. В гидротермальном урочище Пымвашор отмечается резкое сокращение размеров раковин моллюсков (Беспалая и др., 2011). В изученных коллекциях ЗИН РАН из горячих источников также наблюдается уменьшение параметров раковины лимнеид по сравнению с моллюсками континентальных водоемов. Сокращение размеров моллюсков в более высоких широтах отмечалось в работах многих авторов (Березкина, Старобогатов, 1988; Винарский и др., 2007). В данном случае сокращение размеров раковины в горячих источниках можно рассматривать как один из результатов реализации адаптивных стратегий видов (высокая скорость воспроизводства, повышенная плотность поселений, большие энергетические затраты) (Беспалая и др., 2011).

Для сравнения также были рассмотрены морфологические характеристики моллюсков рода *Anisus* (Planorbidae) и *Melanoides* (Thiaridae), обитающих в термах. У представителей вида *Melanoides tuberculatus* также отмечается сокращение размеров раковины (Жадин, Старостин, 1948).

Катушки встречаются в термальных источниках Пымвашор намного реже, чем лимнеиды. Были сделаны промеры катушек из термальных и континентальных водоемов Байкала, Чукотки, Большеземельской тундры, Камчатки, Южного Урала и др. Отмечено, что представители рода *Anisus* обитают при более низкой температуре, чем лимнеиды, зачастую в местах разлива гидротерм и выхода их в водоемы с нормальным температурным режимом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Березкина Г.В., Старобогатов Я.И. Труды ЗИН АН СССР. 1988. Т. 174. 306 с.
2. Беспалая Ю.В., Болотов И.Н., Усачева О.В., 2011. Население моллюсков Субарктической гидротермальной экосистемы в зимний период // Зоол. журнал. Т. 90. №11. с. 1304–1322.
3. Винарский М.В., Андреев Н.В., Каримов А.В., 2007. Широтная изменчивость размеров пресноводных легочных моллюсков (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) в Западной Сибири // Экология. № 5. С. 369–374.
4. Жадин В.И., Старостин И.В. Тропический моллюск *Melanoides tuberculatus* Müll. в Средней Азии // Доклады Академии Наук СССР. 1948. Т. LX, № 1.
5. Круглов Н.Д. Моллюски семейства прудовиков Европы и Северной Азии. Смоленск: СГПУ, 2005. 507 с.
6. Хмелева Н.Н., Голубев А.П., Лаенко Т.М., 1985. Экология брюхоногих моллюсков из горячих источников Камчатки // Журн. общ. биол. Т. 46. № 2. С. 230–240.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF THERMAL SPECIES OF GASTROPODS (FAMILIES LYMNAEIDAE, PLANORBIDAE, THIRARIDAE)

I.S. Paltser

Hydrothermal systems are unique natural complexes. They are natural thermostats, where water temperature of springs sources fluctuate insignificantly during quite long periods. Constancy of temperature and hydrochemical conditions makes hydrotherms, are more kindly habitats in comparison with zonal variants. Gastropods developed and fixed complex of physiological and biochemical adaptations which allow successful exist in the high temperature conditions. Observed collections show us decreasing of Lymnaeidae shell parameters in comparison of mollusks inhabits continental waters.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЛИФОСАТСОДЕРЖАЩЕМУ ГЕРБИЦИДУ В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ *DAPHNIA MAGNA*

Папченкова Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (ИБВВ РАН) Борок, Россия.

e-mail: gala_al@mail.ru

Глифосатсодержащие гербициды широко используются с середины 70-х годов прошлого века. Действующим веществом служит водный раствор изопропиламиновой соли глифосата, на основе которой создано множество высокотехнологичных системных гербицидов широкого спектра действия: раундап, раундап био, глисол, глифосат, торнадо, ураган и многие другие. В силу широкомасштабного применения этих гербицидов необходимо изучение их токсических свойств в разных экосистемах, в том числе в водной, и, соответственно, изучение токсического действия на жизнедеятельность и устойчивость к этим ядам гидробионтов. К сожалению, в отечественной литературе нами не найдено данных о содержании глифосата в природных водоемах. В США проводится периодический мониторинг содержания пестицидов в воде. Так, в отчете за период наблюдений с 1998 по 2003 гг. (Frans, 2004) отмечается, что в воде всех исследуемых водотоков присутствует глифосат в концентрации от $< 0,1$ (следы) до 2,0 мкг/л. Причем его содержание значительно повышается после ливней, что очевидно связано с вымыванием глифосата из почвы дождевой водой. Литературные данные по исследованию токсичности глифосата в основном касаются оценки острой токсичности (Сох, 2004; Tsui, Chu, 2003). Вопросы адаптации к глифосату рассматриваются, главным образом, применительно к растениям и почвенным микроорганизмам (Ayres, 2003; Merivani, 1986). Вопросы приспособления животных к токсическому веществу, а также увеличение или снижение их резистентности токсикантам чрезвычайно важны (Флеров, 1971; Хлебович и др. 1996). Известны работы по повышению резистентности гидробионтов, в частности, разных ракообразных, к солености (Хлебович, Бергер, 1975), сточным водам (Флеров и др., 2003), повышенному содержанию ионов калия (Калинкина, Пименова, 2002) и др.

Целью настоящей работы было обобщение результатов серии экспериментов по исследованию влияния одного из глифосатсодержащих гербицидов на жизнедеятельность нескольких поколений *Daphnia magna*. Изучалось изменение размеров рачков и их репродуктивных показателей в ряду семи поколений, частота морфологических аномалий и активность карбогидраз и протеиназ в ряду четырех поколений. Выбор *Daphnia magna* Straus в качестве тест-объекта обусловлен тем, что ракообразные являются важным трофическим звеном водных экосистем, их высокой чувствительностью к токсикантам, легкостью культивирования и высокой скоростью воспроизводства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Биотестирование вышеназванной серии опытов проводились по одной схеме. Эксперимент проводился на культуре *D. magna*, размножающейся в лаборатории партеногенетически. Тестирование проводили в 15-суточном тесте. Пятнадцатисуточный тест был выбран как оптимальный для решения поставленных задач, так как за это время рачок развивался до половозрелой особи и давал 2-3 выводка, молодь из 3-его выводка использовали для запуска линии следующего поколения. Генетически однородных рачков, возраст которых

был менее 24 часов, рассаживали в стаканы по 1 штуке в каждый, в 10-15 повторностях для каждой концентрации токсиканта и контроля (чистая вода). Среду готовили в концентрациях 0.02 мг/л, 0.2 мг/л, 2.0 мг/л, 25.0 мг/л, 50.0 мг/л (в пересчете на глифосат). Выбор такого диапазона концентраций токсиканта был обусловлен следующими обстоятельствами: 1) 0.02 мг/л – ПДК глифосата в воде водоемов согласно “Гигиеническими нормативами содержания пестицидов в объектах окружающей среды. ГН 1.2.1323-03Э” утв. Главным Государственным санитарным врачом РФ 02.05.2003; 2) 50.0 мг/л – предельная сублетальная концентрация, установленная нами в предварительных экспериментах. Для приготовления растворов токсиканта использовали гербицид, имеющий торговое название "Раундап" (Монсанто, США). Средство представляет собой водный раствор глифосата в концентрации 360 г на 1 литр. Рачков ежедневно кормили суспензией клеток водоросли *Chlorella vulgaris* Beyer., культура которой поддерживается в лаборатории. Один раз в сутки контролировали наличие или отсутствие помета, пересчитывая народившуюся молодежь, выборочно измеряли ее длину. На 15-й день эксперимента измеряли длину взрослых самок. Было проанализировано 7 поколений рачков, экспонировавшихся в токсиканте с концентрациями 0.02 мг/л, 0.2 мг/л, 2.0 мг/л, и 4 поколения – в концентрациях 25.0 мг/л, 50.0 мг/л. После завершения эксперимента в каждом поколении подсчитывали суммарную плодовитость на 1 самку, число пометов на 1 самку и количество новорожденных в одном вымете, измеряли длину тела взрослых рачков на 15-й день и нарождавшейся молодежи.

Также на 15-й день из растворов концентрацией 25.0 мг/л, 50.0 мг/л и чистой воды фиксировали рачков для исследования морфологических отклонений и активности гидролаз. Тератогенный эффект действия раундапа изучали по морфологическим отклонениям в строении хитинизированных структур *D. magna*. Анализировались следующие структуры: постабдомен, коготки, анальные зубцы, головной щит, рострум, хвостовая игла (Папченкова, Гребенюк, 2008). При морфологических описаниях использовали общепринятую терминологию (Мануйлова, 1964). Для определения ферментативной активности в целом организме дафний при помощи стеклянного гомогенизатора готовили суммарные гомогенаты из нескольких сотен рачков. Определяли активность карбогидраз: общую амилолитическую активность (ОАА), общую протеолитическую активность (ОПА) (Папченкова и др., 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние токсиканта на *D. magna* проявилось уже в родительском поколении. Отклик на токсикант родительского и первого поколений рачков, экспонируемых при низких концентрациях 0.02 мг/л, 0.2 мг/л, 2.0 мг/л, был диаметрально противоположным (Папченкова, 2007). Очевидно, это связано с разными условиями развития особей. Рачки родительского поколения были помещены в раствор раундапа новорожденными от неэкспонированных в токсиканте матерей, в то время как особи I-ого поколения рачков прошли все стадии развития, включая оогенез и эмбриогенез, в токсиканте. Для концентраций 0.02 мг/л, 0.2 мг/л, 2.0 мг/л характерно, что во всех поколениях, кроме I-ого, число новорожденных на один помет в контроле было больше, чем в опыте и наоборот число пометов в опытных линиях, как правило, было выше, чем в контроле. Можно предположить, что учащенные выметы, т.е. ускоренное увеличение численности является защитой культуры от вымирания под влиянием токсиканта. Вследствие такого ускоренного размножения на свет появляются ослабленные особи. Если при низких концентрациях наблюдается некоторый стимулирующий плодовитость эффект, то с увеличением концентрации однозначно появляется угнетающий эффект. Плодовитости самок, экспонируемых в растворах токсиканта в концентрациях 25.0 мг/л и 50.0 мг/л, достоверно ниже плодовитости самок контрольной линии во всех поколениях. Подобное происходит и с другим показателем репродукции – средним числом новорожденных в одном выводе.

Длина тела, как новорожденных, так и взрослых особей на 15-й день экспозиции, в контрольной группе всегда больше, чем экспериментальной. Причем сравнение контрольного варианта с группами с высокой концентрацией токсиканта, обычно дает достоверные различия.

Следует отметить еще один эффект действия раундапа на рачков – уменьшение интенсивности пигментации. Как половозрелые особи, так и нарождавшаяся молодежь из линий, экспонируемых в токсиканте, визуально выглядели более обесцвеченными (рис.1а) по сравнению с интенсивно окрашенными в контроле (рис.1б). Этот эффект сохранялся на

протяжении всего эксперимента. Очевидно, это связано с уменьшением числа и измельчением клеток жирового тела в результате компенсации негативного воздействия яда, что позволило поддерживать адекватную жизнедеятельность за счет усиленного использования функциональных резервов. Визуально рачки выглядели маложизнеспособными.

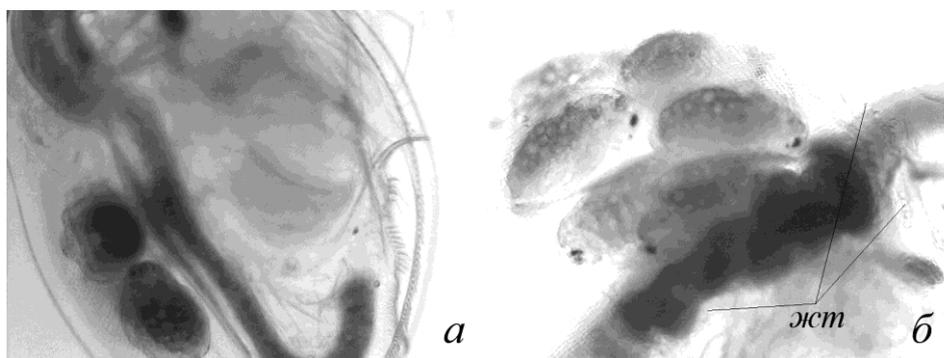


Рис.1. Состояние дафний из токсиканта (а) и чистой воды - контроль (б), обозначение: жт – жировое тало.

В дополнительно проведенных острых тестах по выживаемости молоди рачков из IV-ого поколения при концентрации раундапа 25 мг/л величина средней летальной концентрации LC_{50} (96 ч) составила 14 мг/л, хотя перед началом эксперимента в предварительных тестах на молоди рачков материнской культуры *D. magna* величина LC_{50} была 98 мг/л. Снижение значений LC_{50} у рачков IV-го поколения по сравнению с материнской культурой позволяет предположить наличие аккумуляции токсического эффекта в ряду поколений.

В 15-сут. эксперименте выявлен тормозящий эффект глифосата в концентрации 25.0 мг/л и 50.0 мг/л на активность карбогидраз (ОАА снижается на 37–50% от контроля) и стимулирующий эффект на активность протеиназ (ОПА увеличивается на 33–43% от контроля) в I-ом поколении *D. magna*. Выявленные изменения, наряду со снижением величины отношения ОАА/ОПА, могут отражать увеличение роли белков в метаболизме у дафний при действии сублетальных концентраций гербицида. Во II-ом и III-ем поколениях происходит двукратное снижение величины наблюдаемых эффектов, свидетельствующее о снижении адаптационного потенциала в последующих поколениях. В то же время активность сахаразы снижается в большей степени у рачков III-го поколения по сравнению с материнской линией, демонстрируя аккумуляцию токсического эффекта. Различия в направленности эффектов на активность карбогидраз (ОАА и сахаразы), выявленные при изучении динамики изменения ферментативной активности при действии раундапа в 3-х поколениях рачков, по всей вероятности, могут быть обусловлены большей адаптационной пластичностью панкреатической α -амилазы, стоящей в начале ферментативной цепи, по сравнению с глюкоамилазой, мальтазой и сахаразой, локализованными в мембране и осуществляющими промежуточные и заключительные этапы гидролиза углеводов (Папченкова и др., 2009).

Отличий в морфологических отклонениях первых трех поколений дафний контрольных и опытных особей, содержащихся в растворе раундапа, не выявлено. В IV поколении дафний, содержащихся в растворе токсиканта 50,0 мг/л, появляются патоморфологические отклонения, не отмеченные у контрольных экземпляров. Доля рачков из токсиканта с деформациями составила 32%. Морфологические аномалии в строении дафний здесь представлены следующими формами: 1) уродливое строение головного щита – голова приплюснуто-пологая, теменная часть иногда почти не выражена (деформация не механической природы!); 2) рострум или изогнут вверх, искривлен, или резко выделен (такие особи составляют почти половину рачков с деформациями); 3) хвостовая игла может быть волнисто-изогнутой; 4) постабдомен неправильной формы, коготки сильно изогнуты, либо искривлены. Следует отметить еще один морфологический признак, заслуживающий внимания. Зубцы, составляющие вооружение дорзальной части постабдомена, бывают иногда двойными (т.е., из одного основания выходят два зубца). Это встречается как у контрольных, так и у опытных экземпляров. И только в эксперименте (IV поколение) можно было встретить тройные зубцы на массивном, неровно разросшемся основании (Папченкова, Гребенюк, 2008).

ВЫВОДЫ:

Растворы раундапа в сублетальных концентрациях в 15 суточных тестах оказывают угнетающее действие на репродукцию и линейные размеры тела *Daphnia magna*, достоверно снижают ОАА и повышают ОПА от контроля. Воздействуют на морфологические параметры, что прослеживается с IV поколения и выражается в появлении патоморфологических отклонений в строении ряда структур рачков. Снижение значений LC₅₀ у рачков IV-го поколения по сравнению с материнской культурой позволяет предположить наличие аккумуляции токсического эффекта в ряду поколений. Все это свидетельствует об отсутствии адаптаций к действию сублетальных концентраций гербицида в ряду поколений *Daphnia magna*, но отмечено существенное снижение резистентности к гербициду в IV-ом поколении дафний по сравнению с материнской.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинкина Н.М., Пименова И.В. Увеличение резистентности *Simocephalus serrulatus* Koch при акклимации к повышенным концентрациям ионов калия // Биология внутренних вод. 2002. № 3. С. 93-96.
2. Мануйлова Е.Ф. Ветвистоусые рачки (Cladocera) фауны СССР. М.-Л., Наука. 1964. 327 с.
3. Папченкова Г.А. Исследование хронической токсичности гербицида «Раундап» в ряду поколений *Daphnia magna* // Токсикологический вестник. 2007. № 5. С. 14–17.
4. Папченкова Г.А., Гребенюк Л.П. Влияние сублетальных концентраций гербицида раундап на размеры, плодовитость и морфологические параметры *Daphnia magna* Straus (Cladocera) // Токсикологический вестник. 2008. № 4. С. 27–30.
5. Папченкова Г.А., Голованова И.Л., Ушакова Н.В. Репродуктивные показатели, размеры и активность гидролаз *Daphnia magna* в ряду поколений при действии гербицида «Раундап» // Биология внутренних вод. 2009. № 3. С. 105-110.
6. Флеров Б.А. К вопросу о приспособлении гидробионтов к токсическому фактору // Гидробиологический журнал. 1971. Т. VII. № 6. С.61-67.
7. Флеров Б.А., Гремячих В.А., Изюмов Ю.Г. Плодовитость и размеры *Ceriodaphnia affinis* Lill. в ряду поколений при действии бытовых сточных вод // Известия АН. Серия биологическая. 2003. № 3. С. 375-377.
8. Хлебович В.В., Бергер В.Я. Некоторые аспекты фенотипической адаптации // Журнал общей биологии. 1975. Т. XXXVI. № 1. С. 11- 25.
9. Хлебович В.В., Комендантов А.Ю., Орлова М.И., Петухов В.А., Сабанеева Е.В. Акклиматизация как фундаментальное свойство животных организмов // Информационный бюллетень РФФИ. 1996. Т. 4. № 4. С.147.
10. Ayres Ed. Roundup-resistant weeds embarrass Monsanto // World Watch. 2003. Vol.16. № 4. P. 8.
11. Cox C. Glyphosate // Journal of Pesticide Reform. Winter. 2004. Vol. 24. № 4. P. 11–15.
12. Frans L.M. Pesticides Detected in Urban Streams in King County. Washington. 1998-2003 // U.S. Geological survey Scientific Investigations Report 2004-5194. 2004. <http://pubs.usgs.gov/sir/2004/5194/pdf/sir20045194.pdf>
13. Merivani Y.N. Effect of tillage, glyphosate, and sethoxydim on quackgrass (*Agropyron repens*) in a corn (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) rotation (bud bank, rhizome profile, adaptation components, growth increments) // Dissertation Abstracts International. 1986. Vol. 46. № 10. P.3273.
14. Tsui M.T.K., Chu L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors // Chemosphere. 2003. V. 52. P.1189–1197.

STUDIES OF THE RESISTANCE TO CONTAINING GLIFOSAT HERBICIDE IN A LINE OF *DAPHNIA MAGNA* GENERATIONS

G.A. Papchenkova

The effect of Roundup sublethal concentrations of 0.02, 0.2, 2.0, 25.0, 50.0 mg/l (in terms of glyphosate) on successive generations of *Daphnia magna* Straus was studied. The fertility, brood quality, body length, morphologic parameters as well as carbohydrases and proteinases activities of daphnia were estimated. The influence of toxicant both on parents and the succeeding generations were observed. The adaptation of *Daphnia magna* to Roundup could not be found in successive generations, but lowered resistance to herbicide relative to parent culture was noted in row of generations.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ОРГАНА ОБОНЯНИЯ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПЕЛАГОФИЛЬНОЙ КАРПОВОЙ РЫБЫ – БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБА *Hypophthalmichthys molitrix*

Н.И. Пашенко, А.О. Касумян

Биологический факультет Московского государственного университета им.

М.В.Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: visitgrusha@gmail.com

Обоняние является важнейшей дистантной сенсорной системой у рыб, его участие обеспечивает реализацию разнообразных адаптивных форм поведения у рыб разной систематики и образа жизни. Исследования последних лет показывают существование значительного разнообразия рыб по анатомии органа обоняния и количеству и типу рецепторных клеток в нем, особенностям распределения рецепторных клеток в обонятельной выстилке и др. Несмотря на значительное число выполненных работ до настоящего времени нет достаточно полного представления о развитии структуры и функции органа обоняния в онтогенезе рыб от момента его закладки до дефинитивного состояния. Цель настоящей работы состояла в изучение процесса формирования макро и микроморфологии органа обоняния в онтогенезе белого толстолоба *Hypophthalmichthys molitrix* – пелагофильной карповой рыбы (Cyprinidae). В задачи работы входило проследить за развитием макроструктур органа обоняния, выяснить время появления и сроки дифференциации обонятельных рецепторных клеток, изучить динамику качественных и количественных изменений структуры органа обоняния и клеточных компонентов обонятельного эпителия.

Для исследования использованы эмбрионы, личинки, мальки и половозрелые особи толстолоба. Обозначение морфологического развития ранней молодежи дано по С.Г.Соину (1963). Для электронного микрофотографирования объекты фиксировали 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,2-7,4). Спустя сутки препараты 2-4 часа промывали в 0,15 М фосфатном буфере и дофиксировали 2 часа в 1%-ом растворе четырехоксида осмия. Дегидрировали в восходящем градиенте этанола, а затем в ацетоне. Обезвоженные препараты высушивали в критической точке, напыляли золотом и исследовали в сканирующем электронном микроскопе. Измерения выполнены окулярным микрометром на световом микроскопе, либо по фотографиям, полученным с помощью электронного микроскопа.

В световом микроскопе парные закладки органа обоняния толстолоба (обонятельные плакиды) различимы через 14 ч с момента осеменения икры при температуре воды 22-24°C (V этап). В это время плакиды представляют собой небольшие овальные утолщения эктодермы на переднебоковой поверхности головы вперед и медиальнее глаз. Плакиды несколько выпуклы и покрыты обычными клетками покровного эпителия. Затем плакиды превращаются в массивные утолщения (VI этап). К моменту вылупления зародыша из оболочки икринки (VII этап, возраст 24 ч) за счет резорбции эпителиальных клеток в центральной зоне обонятельной плакиды, образуется неглубокая обонятельная ямка. Свободная поверхность обнажившихся подстилающих клеток из-за большого числа выростов и углублений и иных электронотражающих свойств выглядит более темной и бугристой. Клетки этого слоя служат опорными для дифференцирующихся рецепторных обонятельных клеток, булавы которых появляются на поверхности вскоре после образования обонятельной ямки. На булавах из цилиарных почек начинают расти жгутики.

У предличинок спустя 12 ч после вылупления (VIII этап, или этап A₁) орган обоняния выглядит в виде неглубокой ямки, плоское дно которой покрыто непрерывным рецепторным эпителием, на поверхности которого видны булавы жгутиковых и микровиллярных рецепторных клеток, их соотношение близко к 2:1, общее число – около 300 шт. Булавы жгутиковых рецепторов разнообразной формы, от 0,75 до 3 мкм в диаметре. На вершинах некоторых из них имеются пузырьки. Число жгутиков варьирует от 5 до 14, а длина достигает 5 мкм при диаметре 0,25 мкм. У большинства микровиллярных рецепторных клеток булава выражена слабо. Одновременно наблюдаются рецепторные клетки на различных стадиях дифференцировки: от появления обонятельных булав на поверхности эпителия и начала роста жгутиков и микровилл, до их полного развития. Некоторые булавы некротически изменены и разрушаются. Свободная поверхность опорных клеток покрыта многочисленными

микровиллеподобными выростами. Границы между соседствующими клетками плохо различимы. Малочисленные сформированные и дифференцирующиеся мерцательные клетки с киноцилиями на различных стадиях роста разбросаны по всей обонятельной выстилке. В световой микроскоп хорошо видно движение воды в обонятельной ямке спереди назад, вызванное работой мерцательных клеток. Прижизненное окрашивание метиленовым синим показывает наличие единичных секреторных клеток, однако стоматины этих клеток у молоди этого возраста не выявлены.

Спустя сутки с момента вылупления (IX этап, или этап A₂) головной отдел зародыша обособляется от желточного мешка и орган обоняния оказывается в дефинитивном положении на дорсальной стороне головы. При этом орган не меняет своего положения относительно глаз и головного мозга. Обонятельная ямка немного увеличивается в размерах и становится глубже. Общее количество рецепторных клеток увеличивается, но их соотношение остается прежним, они равномерно распределены по всей обонятельной ямке. Среди жгутиковых клеток большинство имеет 5-7 жгутиков, но встречаются клетки с большим числом жгутиков (до 14). Многие рецепторные клетки обоого типа находятся на разных стадиях дифференцировки. В этом возрасте впервые замечены рецепторные клетки с комплексными жгутами. Еще через сутки мерцательные клетки становятся столь многочисленными, что их киноцилии маскируют рецепторные клетки.

К моменту перехода молоди на внешнее питание (X этап, или этап B) обонятельная ямка имеет каплевидную форму, ее дно сильно углублено в ростральной части и покрыто непрерывным рецепторным эпителием. Число клеток с комплексными жгутами возрастает. По-прежнему много рецепторных клеток находится на разных стадиях дифференцировки. Мерцательные клетки наиболее плотно располагаются по ростральному краю обонятельной ямки. У молоди этого этапа впервые мерцательные клетки появляются на голове личинок за пределами обонятельной ямки. Циркуляции воды у дна обонятельной ямки еще больше усиливается. На XI-XIV этапах развития обонятельная ямка продолжает углубляться и постепенно превращается в носовой мешок. На дне вдоль длинной оси формирующегося органа образуется складка первой центральной обонятельной складки. Она делит обонятельную полость на две части - медиальную и латеральную части. Обонятельная выстилка мало отличается от таковой у личинок X-го этапа, но количество рецепторных и прочих клеток эпителия закономерно возрастает. Дно носового мешка выстлано непрерывным рецепторным эпителием, большинство его клеток не отличается от рецепторов взрослых рыб. Относительное количество клеток с комплексными жгутами постепенно уменьшается. Мерцательные клетки небольшими группами располагаются среди рецепторного эпителия, а также покрывают края обонятельного отверстия и прилегающую к нему узкую полосу на поверхности головы.

К концу личиночного периода развития (XV этап, или этап E) носовой мешок увеличивается и сильно углубляется, начинается формирование обонятельной розетки: развивается центральная складка, а к концу этапа в ростральной части дна появляются складки двух боковых складок, симметричных относительно центральной. Обонятельное отверстие приобретает сложные очертания, на латеральном и медиальном краях появляются утолщения, которые к концу этапа превращаются в суперфициальные выросты. С образованием розетки рецепторные клетки встречаются только в ростральной части дна носового мешка, на боковых поверхностях растущих обонятельных складок и между ними. Мерцательные клетки впервые образуют крупные группы, имеющие вид тяжей и островков. Они расположены на сводах носового мешка, на краях обонятельного отверстия и вокруг него снаружи, покрывают латеральное и медиальное суперфициальные выросты. В нерцепторной зоне обонятельной выстилки среди мерцательных клеток присутствуют островки эпителиальных клеток, характерных для рыб старших возрастов, с уплощенной поверхностью и микрогребнями. Впервые такие клетки появляются на гребне центральной складки, а затем на дне носового мешка между складками. Среди эпителиальных клеток можно заметить стоматины секреторных клеток. Форма и размеры рецепторных и прочих клеток обонятельной выстилки неотличимы от дефинитивных клеток. Также как и на предыдущих этапах, в эпителии множество дифференцирующихся рецепторных и мерцательных клеток.

На первом мальковом этапе развития (XVI этап, или этап F) суперфициальные выросты удлиняются навстречу друг другу, при этом латеральный несколько опережает медиальный, и, срастаясь, образуют носовой мостик, разделяющий обонятельное отверстие на переднюю (входную) и заднюю (выводную) ноздри. Образование носовой перемычки происходит асинхронно в левом и правом органах. Происходит дальнейшее увеличение числа и размеров обонятельных складок: в начале этапа имеется 3 складки, к концу этапа 7 складок формируют овальную розетку стреловидного типа. Складки образуются симметрично парами синхронно в обоих органах. Складки утолщены, имеют свободный дистальный конец и на плоском пилоне приподняты над дном носового мешка. С XVI этапа обонятельная выстилка превращается в прерывистый рецепторный эпителий, в котором рецепторные клетки группируются в более или менее изолированные островки и располагаются на боковой поверхности складок, среди опорных клеток. Изредка встречаются рецепторы с комплексными жгутами. С этого возраста рецепторные клетки уже не встречаются вне обонятельных складок. Множество рецепторных и мерцательных клеток находится на разных стадиях дифференциации. Нерцепторный безресничный эпителий покрывает гребень центральной обонятельной складки и проксимальные части гребней боковых складок. Середина, дистальные части гребня, и торец каждой складки также покрыты нерцепторным эпителием с преобладанием мерцательных клеток, сгруппированных в островки неправильной формы, таких же, как и у взрослых рыб. Среди эпителиальных клеток, на обонятельных складках и дне носового мешка, располагаются многочисленные секреторные клетки.

У мальков на XVII этапе на носовом мостике развивается направленный вперед парусовидный гребень и ноздри постепенно приобретают вид, характерный для взрослых рыб. Парусовидный гребень превращает переднюю ноздрю в воронку, благодаря которой ток воды сквозь обонятельную полость еще больше упорядочивается в направлении спереди назад. Мерцательные клетки на поверхности головы вокруг ноздрей отсутствуют. Обонятельная розетка продолжает развиваться: у мальков длиной 29-30 мм имеется 9 складок, у сеголеток длиной 70-80 мм – 17, у молоди длиной 190-200 мм – 23. Начиная с XVII этапа, обонятельная выстилка приобретает черты, характерные для взрослых рыб: рецепторный эпителий располагается исключительно на боковых поверхностях обонятельных складок, жгутиковые клетки многочисленнее микровиллярных (около 60% от общего числа), нерцепторный эпителий образует полосы и островки. На растущих обонятельных складках повсеместно имеются формирующиеся островки рецепторного эпителия.

У половозрелых особей толстолоба эллиптические по форме носовые мешки окружены скелетными капсулами, обонятельные отверстия округлые, на обонятельном мостике имеется хорошо развитый и направленный вперед парус, формирующий воронку. У рыб длиной около 50 см носовые мешки имеют длину 9 мм и ширину 8 мм, обонятельная розетка состоит из 45-51 складки толщиной 70-75 мкм. Нерцепторный эпителий покрывает крышу и своды носового мешка, гребни и торцевые части обонятельных складок, и дно между ними. В состав нерцепторного эпителия входят безресничные, мерцательные и секреторные клетки. Плоская свободная поверхность первых покрыта микрогребнями, образующими рельеф, подобный рисунку отпечатков пальцев, характерный и для наружных покровов толстолоба и других рыб. Между граничащими клетками открываются секреторные клетки. Мерцательные клетки сгруппированы в виде тяжей и островков, на свободной поверхности этих клеток расположены одинаково ориентированные киноцилии (до 40), длиной около 8 мкм и диаметром 0,25 мкм и многочисленные микровиллеподобные выросты, длиной 0,2-0,3 мкм. Ориентация киноцилий, зафиксированных в разных фазах движения, соответствует направлению вентиляции в обонятельной полости.

Рецепторный эпителий располагается только на боковой поверхности обонятельных складок. Над его поверхностью слегка возвышаются булавы рецепторных клеток – сенсорных нейронов. Булавы жгутиковых клеток несут от 5 до 8 (обычно 6) радиально расходящихся жгутиков длиной около 5 мкм и диаметром 0,25 мкм. Они плавно изогнуты и находятся над поверхностью эпителия. Изредка встречаются апиксы жгутиковых клеток с единственным комплексным жгутом длиной 5 мкм и толщиной в два и более раз большей, чем у обычного жгутика. У микровиллярных клеток булавы выражена слабее, она располагается обычно вровень с поверхностью эпителия и несет до 40 тонких микровиллей, диаметром 0,1 мкм и

длиной 1-2 мкм. На долю микровиллярных клеток приходится около 40% от общего числа рецепторных клеток. Между рецепторными клетками располагаются опорные клетки, их свободная поверхность покрыта многочисленными разнообразной формы короткими микровиллеподобными выростами. Среди опорных клеток можно видеть стоматины слизистых клеток. Чередование участков рецепторного эпителия и мерцательного эпителия придает поверхности обонятельных складок характерный «мраморный» рисунок. Такой же вид имеют дно, стенки и своды носового мешка, где группы мерцательных клеток располагаются на поверхности, выстланной плоскими эпителиальными клетками.

Таким образом, выполненное нами исследование показывает, что формирование основных структур органа обоняния у пелагофила толстолоба происходит сходным образом, как и у многих других исследованных видов рыб семейства Cyprinidae, крайне разнообразных по образу жизни и экологии размножения. У карповых рыб сходным образом формируется обонятельная ямка, обонятельная перемычка и носовые отверстия, обонятельная розетка. Носовые отверстия у толстолоба образуются по анцестральному типу, это происходит у молоди длиной 17 мм, находящейся на этапе F (XVI этап). В том же морфологическом состоянии молоди и таким же путем, носовые отверстия формируются у исследованного нами ранее пелагофила белого амура *Stenopharyngodon idella* и фигофила карпа *Cyprinus carpio*. Несколько раньше это происходит у литофила голяна *Phoxinus phoxinus* (этапа E) и позже – у остракофила обыкновенного горчака *Rhodeus sericeus amarus* (этап G) (Пашенко, Касумян, 1983, 1986).

В ходе развития органа обоняния закономерно растет площадь обонятельной выстилки. На предличиночных и личиночных этапах это происходит медленно (за счет увеличения обонятельной ямки), затем этот процесс ускоряется за счет развития обонятельной розетки, увеличения числа и размеров складок. Обонятельная выстилка предличинок и ранних личинок толстолоба, как и большинства других костистых рыб представляет собой непрерывный обонятельный эпителий, что, по-видимому, увеличивает число рецепторных клеток. Другой структурной адаптацией, выявленной у ранней молоди, является в 2-3 раза большее число жгутиков на булавах жгутиковых клеток по сравнению с рыбами старших возрастов. У ранних личинок толстолоба, как и у личинок другого пелагофила белого амура, максимальна численность рецепторных клеток с комплексным жгутом, которые свойственны рыбам с высокой обонятельной чувствительностью (Брошштейн, 1977). Эти адаптации, несомненно, повышают сенсорные возможности обонятельной системы и компенсируют недостаточную рецепторную оснащенность органа обоняния. С возрастом молоди количество рецепторных клеток в органе обоняния быстро возрастает, на это указывают многочисленные дифференцирующиеся рецепторные клетки, наблюдаемые в обонятельной выстилке у личинок и мальков толстолоба. Одновременно, непрерывный рецепторный эпителий преобразуется в прерывистый. Это приводит к появлению в нем специализированных функциональных зон, сенсорных, вентиляционных и др., существенно улучшающих работу органа.

В онтогенезе толстолоба первыми в обонятельной выстилке возникают жгутиковые рецепторные клетки, микровиллярные рецепторные клетки, мерцательные и секреторные клетки появляются позже. Такая же хронология отмечена нами при регенерации обонятельной выстилки рыб (Пашенко, Касумян, 1984). Изучение рецепторных клеток предличинок разного возраста позволило прийти к заключению, что для дифференциации апикальной части рецепторной клетки требуется мене половины суток. Таким образом, скорость роста жгутиков - более 0,5 мкм/ч, микровилллей – более 0,2 мкм/ч, а киноцилий – более 0,8 мкм/ч. Рассчитанные скорости роста жгутиков обонятельной выстилки соответствуют нашим данным по регенерации клеток обонятельной выстилки после аносмазии детергентом тритон-X-100 (Пашенко, Касумян, 1984). Они близки к таковым у простейших, беспозвоночных и земноводных, но значительно превышают скорость роста жгутиков канального сомика *Ictalurus punctatus* (Cancalon, 1983).

Вентиляционная система органа обоняния у толстолоба формируется сходным образом с другими карповыми рыбами. У ранней молоди она представлена в виде нескольких мерцательных клеток, но их количество быстро растет, они выходят за пределы обонятельной ямки, компенсируя, таким образом, несовершенство гидродинамики органа. В течение личиночного и малькового этапов устройство органа усложняется, возникает обонятельная перемычка, ноздри, парусовидный гребень, формируется обонятельная розетка. Эти

преобразования улучшают и стабилизируют вентиляцию органа, компенсируют изоляцию рецепторного аппарата, улучшают и повышают надежность работы системы.

Поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект 10-04-00349), Федеральным агентством по науке и инновациям (Госконтракты №14.740.11.0165, №16.740.11.0174) и Программой “Ведущие научные школы” (проект НШ-719.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бронштейн, 1977. Обонятельные рецепторы позвоночных. Л.: Наука, 1977, 160 с.
2. Пащенко Н.И., Касумян А.О. Некоторые морфофункциональные особенности развития органа обоняния в онтогенезе голяна // Зоол.журн. 1983. Т.62. Вып.3. С.367–377.
3. Пащенко Н.И., Касумян А.О. Дегенеративные и восстановительные процессы в обонятельной выстилке белого амура *Stenopharyngodon idella* (Val.) (Cyprinidae) после действия на нее детергента тритон-Х-100 // Вопр. ихтиологии. 1984. Т.24. Вып. 1. С.128–137.
4. Пащенко Н.И., Касумян А.О. Морфо-функциональные особенности развития органа обоняния карповых рыб (Cypriniformes, Cyprinidae). I. Развитие морфологии и функции органа обоняния в онтогенезе белого амура *Stenopharyngodon idella* (Val.) // Вопр. ихтиологии. 1986. Т.26. Вып. 2. С.303–317.
5. Соин С.Г. Морфо-экологические особенности развития белого амура и толстолобика. – Матер. Всесоюзн. Совещ. По рыб-хоз. Освоению растительноядных рыб – белого амура (*Stenopharyngodon idella*) и толстолоба (*Hypophthalmichthys molitrix*) в водоемах СССР. Ашхабад: Изд-во АН Туркм.ССР, 1963, с 100-137.
6. Cancalon P. Influence of a detergent on the catfish olfactory mucosa. – Tissue and Cell, 1983, v. 15, № 2, p. 245-258.

INVESTIGATION OF OLFACTORY ORGAN DEVELOPMENT IN EARLY ONTOGENY OF PELAGOPHYLIC CYPRINID FISH, SILVER CARP *HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX*

N.I. Pashchenko, A.O. Kasumyan

Development of olfactory organ gross morphology and olfactory epithelium fine structure in ontogeny of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* were studied. Light and scanning electron microscope approaches were used for investigation. Olfactory placode, olfactory pit and first olfactory neurons appeared in embryos just before hatching. First olfactory lamellae appeared on the last larval stage. The total number of olfactory lamellae is 9, 17, 23 and 45-51 in fish with 3, 7-8, 19-20 and 50 cm in body length (TL). Microvillus sensory neurons and ciliated nonsensory cells and mucus cells as well are follow ciliated olfactory neurons which appeared earlier in fish ontogeny. Olfactory neurons create sensory epithelium which is continuous in larval stages and becomes discontinuous with fish age. The dividing of the original single pit opening and incurrent and excurrent nostrils formation is finished at the stage when typical larval characteristics disappear, and the fish take the shape and characteristics of the adult.

ВЛИЯНИЕ РТУТИ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ В КИШЕЧНИКЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

Г.А. Пенькова, И.Л. Голованова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия,

E-mail: penkovds44@gmail.com

Среди антропогенных факторов, влияющих на функционирование экосистем, важнейшее место принадлежит химическому загрязнению. Ртуть рассматривается как один из самых опасных в экотоксикологическом отношении элементов. Масштабы ее антропогенной эмиссии в атмосферу очень велики и соизмеримы с количествами, участвующими в глобальном природном цикле (Моисеенко и др., 2006). Продолжительность жизни ртути в атмосфере невелика (несколько дней), однако в почве и воде время ее жизни составляет сотни тысяч лет.

Поступая в организм преимущественно алиментарным путем, ртуть аккумулируется в различных тканях и органах животных. Она поражает нервную систему, вызывает изменения в почках, печени и крови, нарушает двигательную и секреторную функцию желудочно-кишечного

тракта. Органические соединения ртути наиболее токсичны, поскольку хорошо растворимы в жирах и легко проникают через биологические мембраны. Исследования, проведенные на крысах и различных гидробионтах (ракообразных, личинках насекомых и хищных рыбах) показали, что кишечный барьер сравнительно непроницаем для неорганической ртути, но в случае поступления она выводится значительно быстрее, чем метилртуть (Berntssen et al, 2004).

Механизм токсического действия ртути связан с её взаимодействием с -SH группами белков, в результате чего изменяются свойства ряда жизненно важных ферментов. Изучение биохимического статуса рыб с повышенным содержанием ртути в организме выявило изменения белкового, липидного и углеводного обмена, при этом отмечены деструктивные процессы в тканях, а также нарушение функции клеточных мембран (Немова, 2005). При действии ртути у млекопитающих отмечены изменения активности антиоксидантных ферментов в печени и почках (Filipak et al., 2008). Однако действие этого металла на пищеварительные ферменты млекопитающих из природных популяций в настоящее время изучено крайне слабо.

Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма в настоящей работе на примере животных различных систематических групп (рыбы, птицы, мелкие млекопитающие) рассмотрено влияние накопленной в организме ртути на активность пищеварительных гликозидаз. Выбранные для исследования животные: речной окунь *Perca fluviatilis*, сизая чайка *Larus canus*, бурозубка обыкновенная *Sorex araneus*, бурозубка малая *S. minutus* и рыжая полевка *Myodes glareolus* – представители водных и наземных экосистем, занимают разный трофический уровень и отличаются количеством накопленной ртути.

Определение ртути в тканях животных проводили атомно-абсорбционным методом с использованием анализатора ртути РА-915. В слизистой оболочке медиального отдела кишечника *in vitro* определяли активность гликозидаз: α -амилазы КФ 3.2.1.1, сахаразы КФ 3.2.1.48 и амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал – α -амилазы, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20 (Уголев и др., 1969). Результаты, представленные в виде средних значений и их ошибок ($M \pm m$), обработаны методом дисперсионного анализа ANOVA и последующей оценкой различий при помощи LSD-теста, $p \leq 0.05$

Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике рыб. У половозрелых особей окуня (204 ± 2 г) из природных водоемов Вологодской обл. с нейтральным значением pH воды содержание ртути в мышцах варьировало от 0.11 до 0.61 мг/кг сырой массы ткани (табл. 1).

Таблица 1. Физиолого-биохимические показатели окуня из водоемов с нейтральным значением pH воды ($n = 6-10$ экз.)

| Показатели | Водоем | | |
|--|-------------------|---------------------------|--------------------|
| | Оз. Белое | Шекснинское водохранилище | Оз. Кубенское |
| Содержание ртути в мышцах, мг/кг | 0.11 ± 0.01^a | 0.24 ± 0.02^b | 0.61 ± 0.06^b |
| Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин | 2.85 ± 0.07^a | 2.24 ± 0.06^b | 2.59 ± 0.12^a |
| Активность сахаразы, мкмоль/г·мин | 0.52 ± 0.01^a | 0.45 ± 0.01^b | 0.56 ± 0.03^a |
| K_M гидролиза крахмала, г/л | 1.56 ± 0.12^a | 2.90 ± 0.18^b | 5.68 ± 0.49^b |
| V_{max} гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин | 2.86 ± 0.04^a | 2.64 ± 0.06^b | 4.24 ± 0.11^b |
| K_M гидролиза сахарозы, ммоль | 5.10 ± 0.35^a | 4.88 ± 0.35^a | 10.10 ± 1.18^b |
| V_{max} гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин | 0.63 ± 0.01^a | 0.51 ± 0.01^b | 0.71 ± 0.03^b |

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 разные надстрочные индексы указывают на статистически значимые отличия между показателями в строке, $p < 0.05$.

Большее содержание ртути в организме сопровождалось снижением амилолитической активности и активности сахаразы на 10–20%. Изучение кинетических характеристик гидролиза крахмала и сахаразы выявило прямую корреляцию между величиной константы Михаэлиса (K_M) и уровнем накопления ртути в мышечной ткани. У рыб с большим содержанием ртути значения K_M гидролиза крахмала и сахаразы выше в 2–3.6 раза, что свидетельствует о снижении фермент-субстратного сродства и скорости начальных этапов ассимиляции углеводов.

У рыб, длительное время живущих в условиях acidификации, отмечено значительное снижение значений K_M , отражающее увеличение сродства ферментов к субстрату с ростом накопления ртути (Табл. 2). Так, у окуня из acidных озёр Дарвиновского заповедника (оз. Дубровское и Мотыкино, pH воды 4.5) K_M гидролиза ди- и полисахаридов в 2–10 раз ниже по сравнению с рыбами из оз. Хотавец (pH воды 7.4). Это может быть обусловлено более высоким накоплением ртути в кишечнике окуня из acidных озёр (до 80% от содержания в мышцах) по сравнению с рыбами из водоемов с нейтральным значением pH воды (лишь 25% от содержания в мышцах) (Степанова, Комов, 1997) и иметь адаптивный характер.

У окуня из 3-х acidных озёр Новгородской области (Роговское, Чудское и Малое Горейское) содержание ртути в мышцах составляло 0.18, 0.36 и 0.49 мг/кг, в кишечнике – 0.02, 0.05 и 0.09 мг/кг сырой массы ткани соответственно. По мере увеличения концентрации ртути отмечено достоверное снижение амилолитической активности и активности сахаразы в 1.4-1.6 раза. Сравнение кинетических характеристик гидролиза крахмала выявило прямую, а гидролиза сахаразы – обратную корреляцию между величиной K_M и уровнем накопления ртути в кишечнике окуня. С ростом содержания ртути K_M гидролиза крахмала увеличивалось в 1.3-1.8 раза, K_M гидролиза сахаразы снижалось в 1.4 раза. Поскольку содержание ртути в кишечнике окуня исследованных озёр не превышало 20% ее содержания в мышцах, по всей вероятности, направленность изменений характеристик пищеварительных гликозидаз в большей мере зависит от концентрации ртути в кишечнике, чем в мышечной ткани.

Таблица 2. Физиолого-биохимические показатели окуня из водоемов с кислым значением pH воды (n = 10).

| Показатели | Озеро | | |
|--|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | Хотавец (pH воды 7.4) | Дубровское (pH воды 4.5) | Мотыкино (pH воды 4.5) |
| Содержание ртути в мышцах, мг/кг | 0.05 ± 0.04 ^a | 0.57 ± 0.04 ^b | 0.46 ± 0.06 ^b |
| Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин | 2.26 ± 0.05 ^a | 1.86 ± 0.03 ^b | 1.93 ± 0.07 ^b |
| Активность сахаразы, мкмоль/г·мин | 0.11 ± 0.04 ^a | 0.54 ± 0.02 ^b | 0.26 ± 0.01 ^b |
| K_M гидролиза крахмала, г/л | 4.26 ± 0.24 ^a | 2.28 ± 0.13 ^b | 0.96 ± 0.05 ^b |
| V_{max} гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин | 2.96 ± 0.06 ^a | 2.74 ± 0.05 ^b | 2.03 ± 0.05 ^b |
| K_M гидролиза сахаразы, ммоль | 33.6 ± 5.93 ^a | 9.26 ± 0.85 ^b | 3.43 ± 1.09 ^b |
| V_{max} гидролиза сахаразы, мкмоль/г·мин | 0.17 ± 0.01 ^a | 0.80 ± 0.02 ^b | 0.28 ± 0.01 ^b |

Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике птиц. Основу рациона сизой чайки составляет рыба и беспозвоночные животные. У птиц с меньшим накоплением ртути (0.05±0.02 мг/кг) амилолитическая активность и активность сахаразы составляли 8.99±0.64 и 0.61±0.05 мкмоль/г·мин, активность панкреатической α -амилазы 42.5±1.10 мг/г·мин. При большем накоплении ртути (0.13±0.02 мг/кг) амилолитическая активность снижалась на 21%, активность α -амилазы – на 36% по сравнению с особями с меньшим накоплением ртути (0.05±0.02 мг/кг).

Активность сахаразы и K_M гидролиза сахарозы (19.2 ± 2.6 мкмоль/г·мин) с ростом содержания ртути достоверно не изменялись.

Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике мелких млекопитающих. Землеройки-бурозубки – мелкие насекомоядные млекопитающие, отличающиеся очень высокой интенсивностью питания и общего обмена, являются важным звеном многих трофических цепей. У бурозубки малой увеличение содержания ртути в слизистой оболочке кишечника сопровождается снижением амилалитической активности на 41–49%, активности мальтазы – на 19%, активность сахаразы не изменялась (табл. 3). У бурозубки обыкновенной с ростом содержания ртути амилалитическая активность и активность мальтазы не изменялись, активность сахаразы увеличивалась на 23%. При этом K_M гидролиза мальтозы снижалось в 1.4 раза, отражая адаптивное увеличение сродства ферментов к субстрату. Поскольку активность исследованных гликозидаз в кишечнике двух видов бурозубок исключительно близка, выявленные различия, по всей вероятности, обусловлены не столько разным спектром и интенсивностью питания, сколько видовыми особенностями влияния ртути на активность пищеварительных гликозидаз.

Рыжая полевка – мелкий мышевидный грызун с коротким жизненным циклом и высокой скоростью метаболизма. У особей с большим накоплением ртути амилалитическая активность была ниже на 20%, а активность сахаразы – на 29%, активность мальтазы не изменялась (табл. 4). Однако значения K_M гидролиза мальтозы снижались в 1.6 раза, что свидетельствует об адаптивном увеличении сродства ферментов к субстрату с ростом накопления ртути.

Таблица 3. Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в слизистой оболочке кишечника у бурозубок с разным накоплением ртути (n = 4–5 экз.)

| Показатель | Бурозубка малая | | |
|--|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| | Содержание Hg, мг/кг сырой массы | 0.02 ± 0.00^a | 0.05 ± 0.00^b |
| | 2.22 ± 0.01^a | 1.14 ± 0.01^b | 1.32 ± 0.03^b |
| Активность сахаразы | 0.11 ± 0.01^a | 0.11 ± 0.01^a | 0.11 ± 0.01^a |
| Активность мальтазы | 9.16 ± 0.13^a | 8.76 ± 0.12^a | 7.46 ± 0.12^b |
| Бурозубка обыкновенная | | | |
| Содержание Hg, мг/кг сырой массы | 0.03 ± 0.00^a | 0.05 ± 0.00^b | 0.14 ± 0.01^b |
| Амилалитическая активность | 2.35 ± 0.00^a | 2.34 ± 0.01^a | 2.37 ± 0.01^a |
| Активность сахаразы | 0.13 ± 0.00^a | 0.12 ± 0.00^a | 0.16 ± 0.01^b |
| Активность мальтазы | 21.9 ± 0.57^a | 21.4 ± 0.28^a | 20.2 ± 0.28^a |
| K_M гидролиза мальтозы, ммоль | 6.08 ± 0.45^a | – | 4.38 ± 0.26^b |
| V_{max} гидролиза мальтозы, мкмоль/г·мин | 3.62 ± 0.08^a | – | 3.65 ± 0.09^a |

Таблица 4. Активность гликозидаз (мкмоль/г·мин) в кишечнике рыжей полевки с разным накоплением ртути (n = 6 экз.)

| Показатель | Рыжая полевка | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | Содержание Hg, мкг/кг сырой массы | 3.70 ± 0.08^a |
| Амилалитическая активность | 24.1 ± 0.67^a | 19.3 ± 0.54^b |
| Активность сахаразы | 3.57 ± 0.15^a | 2.53 ± 0.06^b |
| Активность мальтазы | 7.92 ± 0.29^a | 7.92 ± 0.26^a |
| K_M гидролиза мальтозы, ммоль | 2.68 ± 0.10^a | 1.71 ± 0.15^b |

Таким образом, результаты натуральных наблюдений свидетельствуют о возможности негативного влияния повышенного содержания ртути в организме на гидролиз углеводов в кишечнике водных и наземных животных. Накопление ртути в организме млекопитающих, околородных птиц и рыб из водоемов с нейтральным значением pH воды вызывает неспецифическое снижение активности пищеварительных гликозидаз и сродства ферментов к

субстрату, уменьшая скорость начальных этапов ассимиляции углеводов. В то же время, у мелких млекопитающих (бурозубок, полевок) и окуня, длительное время живущего в условиях acidification, с ростом накопления ртути отмечено адаптивное повышение сродства ферментов к субстрату, что, по всей вероятности, позволяет частично компенсировать неблагоприятное влияние накопленной в организме ртути на скорость переваривания углеводных компонентов пищи.

Приведенные данные позволяют предположить, что ртуть может являться положительным модулятором для ключевых ферментов гидролиза углеводов и вызывать адаптивные изменения фермент-субстратного сродства. Однако, для окончательного решения этого вопроса необходимы дополнительные исследования в условиях *in vitro*. В доступной нам литературе подобные работы отсутствуют. В то же время, влияние тяжелых металлов в экспериментах *in vitro* на кинетические характеристики α -амилазы – фермента, осуществляющего начальные этапы гидролиза полисахаридов, ранее было продемонстрировано на примере зеленой мидии *Perna viridis* L. (Yan et al., 1996). Значения K_M амилазы из пищеварительной железы мидии снижались (т.е. фермент-субстратное сродство возрастало) в 1.6–2 раза в присутствии кадмия, цинка и свинца в концентрации, равной LC_{50} для каждого компонента, что может свидетельствовать об адаптивных изменениях этого показателя в присутствии тяжелых металлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Моисеенко Т.И., Кудрявцева Л.П., Гашкина Н.А. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши: Технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология. М.: Наука, 2006. 261 с
2. Немова Н.Н. Биохимические эффекты накопления ртути у рыб. М.: Наука, 2005. 164 с.
3. Степанова И.К., Комов В.Т. Накопление ртути в рыбе из водоемов Вологодской области // Экология. 1997. № 4. С. 295–299.
4. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с.
5. Berntssen H.K., Hylland K., Julshamn K., Lundebye A.K., Waagbo R. Maximum organic and inorganic mercury in fish feed // Nutrition. 2004. V. 10. № 2. P. 83–97.
6. Filipak N.F., Zanata S.M., Silva de Assis H.C. et al. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus* // Toxicol. in vitro. 2008. V. 22. № 7. P. 1705–1713.
7. Yan T., Teo L.H., Sin Y.M. Effects of metals on α -amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1996. V. 56. № 4. P. 677–682.

INFLUENCE OF MERCURY ON THE DIGESTIVE GLYCOSIDASE ACTIVITY AND THE KINETIC CHARACTERISTICS OF THE CARBOHYDRATE HYDROLYSIS IN VERTEBRATE ANIMALS OF DIFFERENT SYSTEMATIC GROUPS.

G.A. Pen'kova, I.L. Golovanova

Mercury accumulation in organism of mammals, birds and fishes reduces the activity of the digestive glycosidase and the affinity of enzymes to a substratum, reducing the rate of the initial stages of carbohydrates assimilation. In some cases the adaptive increase of the enzyme-substrata affinity is noted, allowing to compensate negative action of mercury.

АДАПТИВНЫЕ РЕАЦИИ МОЛЛЮСКОВ НА НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ СРЕДЫ

Петухова Г.А.

ФГБОУ ВПО Тюменский Государственный Университет,
г. Тюмень, ул. Пирогова 3
e-mail: gpetuhova1@mail.ru

Загрязнение окружающей среды углеводородами нефти является повсеместным и постоянно нарастающим. Растворимая в воде фракция нефти содержит наиболее токсичные и мутагенные компоненты – ароматические углеводороды. Смолистые фракции, находящиеся в грунте, постепенно деградируя, вносят свой токсический вклад в общую картину

экологического неблагополучия. Гидробионты, находящиеся в постоянном контакте с загрязнителем, либо погибают, либо вынуждены приспосабливаться к действию токсических агентов. Представляло интерес изучить возможность адаптации моллюсков к действию нефтяного загрязнения грунта. Проводили в эксперимент с хронической постоянной (2% нефти) и хронической нарастающей концентрацией нефти Шаимского месторождения в грунте.

Анализ выживаемости моллюсков позволил установить (Табл.1), что, уже начиная с 10-го дня эксперимента, жизнеспособность животных снижается, и к 90-му дню все моллюски погибают. В этом варианте эксперимента животные перестают размножаться уже к 60-му дню, хотя еще продолжают появляться молодые животные из ранее отложенных яиц.

Таблица 1. Морфофизиологические показатели моллюсков при хроническом действии грунта, загрязненного нефтью

| Показатели | Изменение показателя по отношению к контролю (в %) на ... дни эксперимента | | | |
|--|--|--------------|-------------|-------------|
| | 10 | 30 | 60 | 90 |
| Выживаемость | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 80,0 ± 2,01 | 61,7 ± 2,44 | 22,5 ± 2,10 | 0 + 0,07 |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 100,0 -0,07 | 100,0 - 0,07 | 86,8 ± 1,70 | 77,9 ± 2,08 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 100,0 - 0,07 | 76,2 ± 2,14 | 57,3 ± 2,48 | 38,7 ± 2,44 |
| О4 (нарастание по 0, 25% каждые 5 дней) | 100,0 - 0,07 | 100,- 0,07 | 82,2 ± 1,92 | 57,8 ± 2,98 |
| Потенциальная плодовитость | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 77,8 ± 2,09 | 48,5 ± 2,51 | 0 + 0,07 | 0 + 0,07 |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 90,6 ± 1,41 | 84,7 ± 1,81 | 72,6 ± 2,14 | 59,4 ± 3,49 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 82,2 ± 2,72 | 46,4 ± 3,54 | 37,8 ± 3,44 | 29,7 ± 3,25 |
| О4 (нарастание по 0, 25% каждые 5 дней) | 89,8 ± 2,15 | 60,5 ± 3,47 | 49,0 ± 3,55 | 36,8 ± 3,43 |
| Реальная плодовитость | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 52,4 ± 2,51 | 21,3 ± 2,06 | 8,6 ± 2,82 | 0 + 0,07 |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 86,7 ± 2,41 | 76,5 ± 3,01 | 61,3 ± 3,46 | 42,7 ± 3,51 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 70,8 ± 3,23 | 36,5 ± 3,42 | 21,3 ± 2,91 | 12,7 ± 2,37 |
| О4 (нарастание по 0, 25% каждые 5 дней) | 77,9 ± 2,95 | 52,8 ± 3,55 | 32,4 ± 3,32 | 24,8 ± 3,07 |
| Масса моллюсков | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 100 -0,07 | 76,5 ± 2,13 | 52,5 ± 2,51 | - |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 100 -0,07 | 90,7 ± 2,06 | 86,4 ± 2,43 | 71,3 ± 3,21 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 100 -0,07 | 87,4 ± 2,36 | 43,2 ± 3,52 | 40,1 ± 3,48 |
| О4 (нарастание по 0, 25 % каждые 5 дней) | 100 -0,07 | 92,7 ± 1,85 | 77,5 ± 2,97 | 58,9 ± 3,50 |
| Поедаемость корма | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 88,8 ± 1,58 | 41,7 ± 2,46 | 17,3 ± 1,90 | - |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 96,7 ± 1,27 | 95,2 ± 1,52 | 94,3 ± 1,65 | 90,4 ± 2,09 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 95,2 ± 1,52 | 83,5 ± 2,64 | 79,6 ± 2,86 | 84,3 ± 2,58 |
| О4 (нарастание по 0, 25 каждые 5 дней) | 97,8 ± 1,04 | 80,9 ± 2,79 | 90,5 ± 2,09 | 84,3 ± 2,58 |
| Двигательная активность | | | | |
| О1 (хронич.2%) | 78,6 ± 2,91 | 51,3 ± 3,55 | 32,4 ± 3,32 | - |
| О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | 94,3 ± 1,65 | 84,8 ± 2,55 | 76,5 ± 3,01 | 66,8 ± 3,34 |
| О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | 84,6 ± 2,56 | 52,3 ± 3,54 | 32,1 ± 3,32 | 20,0 ± 2,84 |
| О4 (нарастание по 0, 25 % каждые 5 дней) | 90,3 ± 2,10 | 67,9 ± 3,32 | 56,8 ± 3,52 | 41,7 ± 3,50 |

Условные обозначения: - отсутствие показателей из-за гибели моллюсков

В вариантах с постепенным нарастанием концентрации нефти в грунте было показано, что моллюски выживают и сохраняют на достаточно высоком уровне все показатели жизнедеятельности. Наиболее высокими являются показатели моллюсков, содержащихся в варианте с постепенным нарастанием нефти в грунте с 0,25% каждые 10 дней.

Более высокие показатели жизнедеятельности моллюсков в варианте с постепенным нарастанием нефти в грунте от 0,25% до 2% каждые 10 дней могут быть связаны с двумя причинами.

Во-первых, возможно, что именно такой темп нарастания концентрации (по 0,25 каждые 10 дней) является оптимальным по сравнению с другими вариантами: по 0,5% каждые 10 дней

или по 0,25% каждые 5 дней. В первом неоптимальном варианте, возможно, слишком быстро нарастает концентрация по величине, а во втором – по темпу. Вероятно, физиологические механизмы животных не успевают перестраиваться и показатели жизнедеятельности в этих вариантах ниже.

Во-вторых, возможно, что у животных в О2 произошли такие же адаптивные сдвиги, как и в других вариантах эксперимента с постепенным нарастанием концентрации нефти, но моллюски содержались при концентрации 2% меньше время: в О2 – 20 дней, в О3 – 70 дней, в О4 – 55 дней.

Для того, чтобы исключить разницу во времени содержания в максимальной концентрации нефти в грунте был поставлен эксперимент, в котором моллюски, по-разному достигая высокую концентрацию нефти (2%), содержались в ней в течение 90 дней (табл.2). Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют о том, что моллюски могут сохранять жизнедеятельность при хроническом 90-дневном действии нефтезагрязненного грунта, если концентрация 2% нефти в грунте достигается постепенно и наиболее оптимальным является вариант с нарастанием концентрации невысокими дозами (по 0,25%) медленным темпом (каждые 10 дней).

Таблица 2. Морфофизиологические показатели моллюсков при хроническом действии грунта с концентрацией нефти 2% на 90 день эксперимента

| Показатели жизнедеятельности (по отношению к контролю, в %) на 90 день действия концентрации 2 % нефти в грунте | Варианты эксперимента | | | |
|---|-----------------------|--|---|--|
| | О1 (хронич.2%) | О2 (нарастание по 0,25% каждые 10 дней) | О3 (нарастание по 0,5% каждые 10 дней) | О4 (нарастание по 0,25 каждые 5 дней) |
| Выживаемость | 0 + 0,01 | 60,4 ± 4,91 | 24,8 ± 4,34 | 48,7 ± 5,02 |
| Реальная плодовитость | - | 43,4 ± 4,98 | 31,3 ± 4,66 | 32,7 ± 4,71 |
| Двигательная активность | - | 85,6 ± 3,53 | 76,7 ± 4,25 | 75,9 ± 4,30 |

Моллюски во всех вариантах эксперимента с нарастанием концентрации нефти в грунте сохраняли высокий уровень плодовитости и двигательной активности уже после достижения высокой концентрации.

Проведенные эксперименты свидетельствуют о возможности адаптации моллюсков к высоким концентрациям нефтяного загрязнения грунта, если эти концентрации достигаются не одновременно, а путем постепенного нарастания. Перестройка физиологических механизмов, активизация механизмов защиты организмов позволяет животным выживать, размножаться и сохранять на высоком уровне двигательную активность при действии высоких концентраций токсиканта. Единовременное действие высокой концентрации нефти приводит при хроническом содержании в ней моллюсков к их гибели, так как не позволяет организмам настроить их адаптивные системы на жизнедеятельность в экстремальных условиях.

ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ НА НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ

Е.С. Петухова¹, Г.А. Петухова¹, А.Г. Перекупка²

¹Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

²ОАО «Гипротюменнефтегаз», Тюмень, Россия

E-mail: es_petukhova@mail.ru

Широкомасштабное нефтяное загрязнение природных территорий Тюменской области выводит на первый план проблему изучения влияния нефтяного загрязнения на живые организмы. Нефть в больших концентрациях оказывает ингибирующее воздействие на рост и развитие растений. При действии нефтяного загрязнения углеводороды нефти оказывают повреждающее действие на мембраны клеток, происходит образование свободных форм кислорода, которые инициируют разрушение липидов – перекисное окисление. К основным продуктам перекисного окисления липидов относятся: диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид, основания Шиффа.

В защите от активных форм кислорода в организме участвуют фенольные соединения, флавоноиды, каротиноиды. В целях активации работы биохимических механизмов защиты клетки возможно применение различных репарагенов, антиоксидантов и антимутагенов. Одним из таких репарагенов является парааминобензойная кислота (ПАБК).

Изучением токсического, мутагенного, канцерогенного влияния нефти на различные живые системы занималось много исследователей. В литературе недостаточно изучены механизмы защиты растений от нефтяного загрязнения. Представляло интерес изучить влияние ПАБК на биохимические системы внутриклеточной защиты. В связи с этим целью работы был анализ активации биохимических механизмов защиты растений и изменений морфофизиологических показателей при действии воды и почвы, загрязненной нефтью.

Нами были поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучить содержание хлорофиллов А и В в элодее канадской, ряске малой, рогозе узколистном, осоке сероватой
2. Исследовать содержание каротиноидов в изучаемых объектах
3. Проанализировать содержание флавоноидов в элодее канадской, ряске малой, рогозе узколистном, осоке сероватой
4. Изучить содержание фенольных соединений в рогозе узколистном и осоке сероватой
5. Исследовать содержание продуктов перекисного окисления в рогозе узколистном и осоке сероватой.

Эксперимент проводился в 2 этапа:

На первом этапе работы было проведено изучение влияния водной вытяжки из почвы, загрязненной нефтью Шаимского месторождения (5%), анализ модифицирующего действия парааминобензойной кислоты при нефтяном загрязнении на ряску малую (*Lemna minor L.*) и элодею канадскую (*Elodea canadensis Michx.*).

Растения помещались в емкости по 200 мл, на дне которых находилось по 50 г почвы, остальной объем заполнялся водой. Было поставлено несколько вариантов: контроль (чистая почва и отстоянная водопроводная вода), опыт 1 (чистая почва, залитая раствором ПАБК в концентрации 0.001% на 1 л воды), опыт 2 (почва с 5% содержанием нефти с Шаимского месторождения, залитая отстоянной водопроводной водой) и опыт 3 (вариант с комбинированным действием нефти и 0.001% раствора ПАБК). В течение 14 дней выращивали элодею, ряску выращивали 7 дней, затем регистрировали физиологические показатели (содержание пигментов фотосинтеза и флавоноидов).

При действии ПАБК было показано снижение эффективности работы системы пигментов фотосинтеза и стабилизация работы системы флавоноидной защиты у элодеи канадской; у ряски малой стимуляция работы системы пигментов фотосинтеза и угнетение системы флавоноидной защиты. При действии нефтяного загрязнения у элодеи и ряски отмечено снижение содержания пигментов фотосинтеза и флавоноидов, что свидетельствует об угнетающем действии нефти на защитные системы растений. При комбинированном действии нефтяного загрязнения и ПАБК у элодеи и ряски выявлено увеличение эффективности работы системы пигментов фотосинтеза.

Таблица 1. Содержание пигментов фотосинтеза в элодее канадской при действии нефти и ПАБК

| Вариант опыта | Хлорофилл А | Хлорофилл В | Каротиноиды |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Контроль | 15.71±0.31 | 9.40±0.19 | 17.10±0.36 |
| Опыт 1 (ПАБК) | 12.33±0.30*** | 6.99±0.26*** | 13.22±0.34*** |
| Опыт 2 (нефть) | 12.88±0.26*** | 7.03±0.16*** | 13.49±0.09*** |
| Опыт 3 (нефть +ПАБК) | 40.52±0.13*** | 10.87±0.23*** | 23.85±0.31*** |

Примечание: * - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта (P <0,05), ** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта (P <0,01), *** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта (P <0,001).

Система флавоноидной защиты при комбинированном действии нефти и ПАБК была высоко эффективной у элодеи и ряски (концентрация флавоноидов увеличивается). Система флавоноидной защиты растений оказалась более чувствительной к действию нефтяного

загрязнения и модифицирующему действию ПАБК на фоне нефтяного загрязнения по сравнению с каротиноидной системой защиты и системой хлорофиллов. Ряска малая по ряду биохимических показателей оказалась более чувствительным тест-объектом по сравнению с элодеей. Способность ПАБК стимулировать работу протекторных систем растений позволяет использовать этот репаративный агент для защиты растений в условиях нефтяного загрязнения.

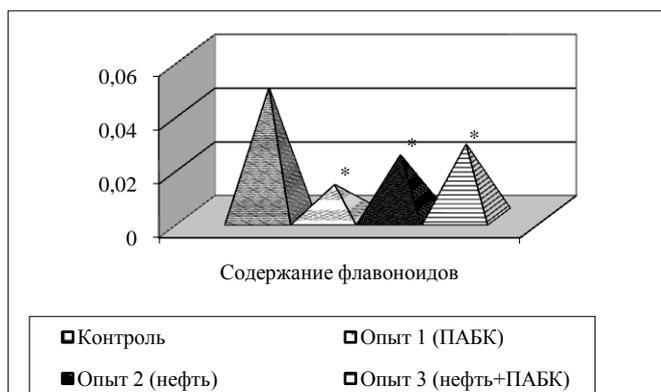


Рис. 1. Содержание флавоноидов в ряске малой при действии нефти и ПАБК.

* - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,05$), ** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,01$), *** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,001$).

Второй этап нашей работы был посвящен оценке степени нефтяного загрязнения территории Кальчинского месторождения. Для достижения поставленной цели на территории месторождения были взяты растения доминантных для данной территории видов: рогоз узколистый (*Typha angustifolia* L.), осока сероватая (*Carex canescens* L.). Отбор проб производился в месте разлива нефти (O1), в 20 м от места разлива (O2) и в 35 м от места разлива (O3), в качестве контроля использовали пробы с фоновой территории.

У рогоза узколистого с Кальчинского месторождения нефти увеличивалось содержание хлорофилла А и каротиноидов во всех опытных вариантах, содержание хлорофилла В повышалось у растений, собранных в 20 м от места аварии. Хлорофилл А является основным пигментом фотосинтеза, но при действии стресс-факторов растению необходимо увеличивать выработку органических веществ, что осуществляется за счет повышения концентрации вспомогательного хлорофилла В.

Анализ содержания фенольных соединений в рогозе узколистом с Кальчинского месторождения нефти (рис.2) выявил увеличение данного показателя во всех опытных вариантах, что свидетельствует об активизации защитной системы растений при действии нефтяного загрязнения.

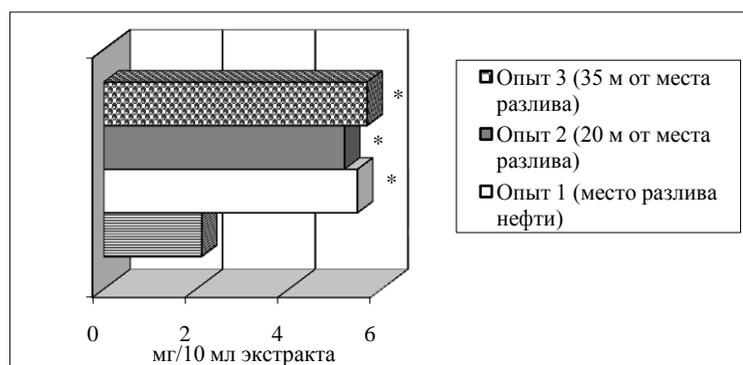


Рис. 2. Содержание фенольных соединений в рогозе узколистом с Кальчинского нефтяного месторождения.

* - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,05$), ** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,01$), *** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,001$).

Содержание флавоноидов у рогоза узколистного снижалось в варианте с растениями, собранными в месте разлива нефти, что указывает на угнетенное состояние флавоноидной системы, которое наступает при высоких концентрациях нефти. Анализируемый показатель увеличивался у растений из района в 20 м от места разлива, что свидетельствует о включении биохимической защиты растений. В варианте с растениями, собранными с 35 м от места аварии содержание флавоноидов выходило на контрольный уровень, это иллюстрирует нормализацию работы антиоксидантной системы защиты.

Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) у осоки сероватой с Кальчинского нефтяного месторождения (рис. 3) увеличивалось по отношению к контролю, что указывает на повреждающее действие нефти. Содержание шиффовых оснований при действии нефтяного загрязнения значительно не отличалось от контроля. Возможно, это объясняется активизацией работы защитных систем растения.

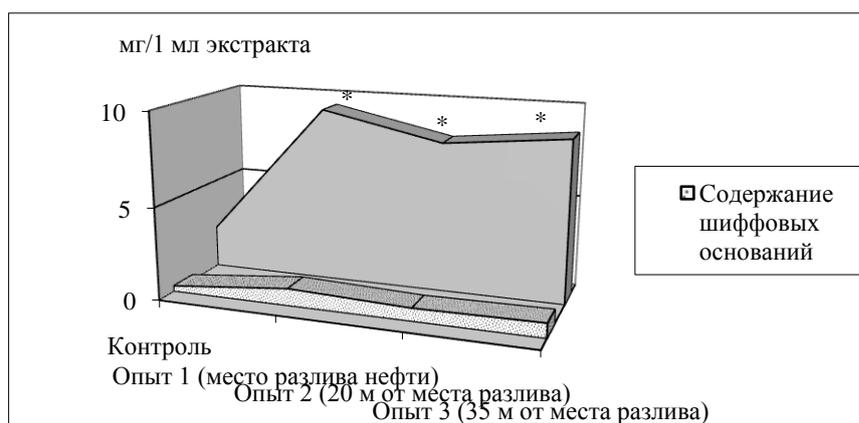


Рис. 3. Содержание шиффовых оснований и диеновых конъюгатов в осоке сероватой с Кальчинского месторождения

* - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,05$), ** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,01$), *** - статистически достоверные различия между контролем и вариантом опыта ($P < 0,001$).

У осоки сероватой, собранной в районах разлива нефти и в 20 м от разлива снижалась концентрация хлорофиллов. У растений, собранных в 35 м от места аварии, увеличивалось содержание хлорофиллов и каротиноидов. Каротиноиды энергично устраняют избыток активных форм кислорода, защищая пигменты и ненасыщенные жирные кислоты липидов от окислительного повреждения.

Содержание фенольных соединений в осоке сероватой возрастало во всех опытных вариантах, что указывает на активизацию биохимической системы защиты растений.

Содержание флавоноидов в осоке сероватой увеличивается у растений, собранных в месте разлива нефти и в 20 м от места разлива, что свидетельствует о включении защитной системы растений.

Таким образом, изучение биохимических систем растений, собранных с Кальчинского месторождения, показало наличие повреждающего действия нефти, проявляющееся в повышении содержания продуктов перекисного окисления липидов: диеновых конъюгатов и шиффовых оснований. Также была выявлена активизация работы систем биохимической защиты клетки, проявляющаяся в увеличении содержания каротиноидов, фенолов и флавоноидов. Наиболее эффективными в защите клеток растений от нефтяного загрязнения, по результатам наших исследований, являются фенольные соединения. Концентрация этих веществ увеличивается как у рогоза узколистного, так и у осоки сероватой во всех опытных вариантах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Добринский Л.Н. Экология Ханты-мансийского Автономного округа / Л.Н. Добринский, В.В. Плотников. Тюмень: Софт Дизайн, 1997. 220 с.

2. Московченко Д.В. Нефтегазодобыча и окружающая среда: эколого-географический анализ Тюменской области: монография. Новосибирск: Наука, Сиб. Предприятие РАИ, 1998. 112 с.
3. Петухова Г.А. Эколого-генетические последствия воздействия нефтяного загрязнения на организмы. Дис. ...доктора биол. Наук. Тюмень, 2007. 526 с.
4. Строева О.Г. Биологические свойства парааминобензойной кислоты // Онтогенез. 2000. Т. 31, № 4. С. 259-283.

PROTECTION MECHANISMS OF BIOCHEMICAL REACTIONS OF WATER PLANTS TO THE OIL POLLUTION

E.S. Petukhova¹, G.A. Petukhova¹, A.G. Perekupka²

¹*Tyumen State University, Tyumen, Russia*

²*JSC «Giprotyumenneftegaz», Tyumen, Russia*

e-mail: es_petukhova@mail.ru

The problem of oil pollution is very serious for Tyumen region. We should protect living organisms from oil pollution. Oil pollution causes becoming of lipid peroxygenation products in the plant cells. Damaging action is removed by the biochemical protecting system (such as carotenoid, flavonoids and phenols). Paraaminobenzoic acid partially eliminates damaging action of oil. It appears in increase of chlorophyll, carotenoid and flavonoids concentration.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ЦЕЛОМОЦИТОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ (HIRUDO MEDICINALIS)

Пигалева Т. А.

*ФГАОУ ВПО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
г. Белгород, Россия*

e-mail: luskina@mail.ru

Поддержания постоянства внутренней среды является важной функцией организма. Особое значение этот процесс имеет для нормальной жизнедеятельности водных животных. Сохранение стабильности происходит за счет сбалансированной работы нескольких систем организма – это изменение проницаемости покровов, выделение излишних солей, потребление воды животным при недостатке жидкости. Некоторые из этих явлений описаны для аннелид. Так, Т.Н. Dietz и R.Н. Alvarado в 1970 г описали способность дождевого червя поддерживать постоянство внутренней среды после помещения в сбалансированный водный раствор или дистиллированную воду. При этом важную роль играли процессы избирательной проницаемости покровов животного. Но все же эти механизмы не являлись идеальными, и через определенное время черви увеличивались в объеме и массе, после чего начиналось активное выделение жидкости и солей (Dietz and Alvarado, 1970). Если, ранее описанные механизмы не способны поддержать стабильность осмотического давления внутренней среды, то включаются клеточные механизмы регуляции. Во время разбавления или концентрирования целомической жидкости в целомоцитах происходят определенные структурные изменения. М. R. Kasschau et al. описали увеличение количества ложноножек у целомоцитов дождевого червя, помещенных в гипертоническую среду. Изменение концентрации раствора способствовало перестройке цитоскелета и влияло на способность клеток к адгезии (Kasschau et al., 2007).

Детального исследования влияния изменения осмотического давления на цитоскелет и структуру клеток целомической жидкости медицинской пиявки ранее не проводилось.

При проведении исследования использовали методы световой и атомно-силовой микроскопии. Линейные параметры клеток определяли при помощи инвертированного светового микроскопа Nikon eclipse Ti в жидкости.

При подготовке препарата для изучения цитоскелета пользовались модифицированной методикой описанной Т. Berdyueva et al., 2005. Клетки подвергали пятнадцатиминутной экспозиции в растворах различной концентрации, затем готовили мазок и пермеабилizировали мембраны целомоцитов при помощи 0,1% раствора тритона X-100. Для проведения измерения упругостных свойств мембран и исследования микрорельефа поверхности использовали методы атомно-силовой микроскопии. В работе применяли кремниевые зонды серии PNP-DB

64675 (NT MDT), жесткостью 0,48 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Hz.

После инкубации в гипотоническом растворе целоמוциты *Hirudo medicinalis* разделились на две группы – клетки, которые сохранили целостность, и клетки, которые получили повреждение мембраны и лишились содержимого. В гипотонической среде клетки приобретали сферическую форму, микрорельеф поверхности приобретал однородный характер, но поверхность всех клеток сохранила небольшое количество борозд и складок, что говорит о возможности части популяции гемоцитов переносить еще большее разбавление раствора.

В изотоническом растворе целоמוциты сохраняли свою естественную форму, поверхность покрывали складки и выросты мембраны. Клетки образовывали ложноножки в виде филоподий. В то же время, изотонический раствор снизил активность целомоцитов по сравнению с нативным препаратом.

После инкубации в гипертоническом растворе клетки приобретали угловатые очертания. Мембрана при этом становилась гладкой, лишенной складок и выростов. Клетки вытягивались вдоль одной из осей, одновременно с уменьшением высоты.

Линейные размеры гемоцитов медицинской пиявки представлены в таблице 1.

Таблица 1. Линейные параметры целомоцитов *Hirudo medicinalis* при воздействии растворов различной концентрации (световая микроскопия).

| | Линейные размеры клеток по длинной оси (μm) | Линейные размеры клеток по короткой оси (μm) |
|-----------------------|---|--|
| Гипотоническая среда | 8,22±0,81 | 7,35±0,85 |
| Изотоническая среда | 5,7±0,7 | 5,1±0,7 |
| Гипертоническая среда | 8,60±0,74 | 7,36±0,73 |

Из таблицы видно, что целомоциты увеличивались в размерах не только в гипотонической, но и в гипертонической среде. Причем в условиях повышенного осмотического давления размеры клеток увеличивались не менее интенсивно, чем в гипотоническом растворе. Было предположено, что целомоциты реагируют на увеличение осмотического давления увеличением количества ложноножек и уплощением клеток. Для проверки этой гипотезы использовали методы атомно-силовой микроскопии, которые позволяют определить высоту клеток (Таблица 2).

Таблица 2. Линейные параметры целомоцитов *Hirudo medicinalis* при воздействии растворов различной концентрации (атомно-силовая микроскопия).

| | Линейные размеры клеток по длинной оси (μm) | Линейные размеры клеток по короткой оси (μm) | Высота клеток (μm) |
|-----------------------|---|--|--------------------|
| Гипотоническая среда | 5,75±1,33 | 4,42±0,9 | 1,01±0,1 |
| Изотоническая среда | 3,47±0,72 | 3,03±0,66 | 0,811±0,19 |
| Гипертоническая среда | 4,42±0,87 | 2,64±0,32 | 0,673±0,18 |

Клетки, которые инкубировали в гипотонических условиях, имели наибольшую высоту, в то время как высота целомоцитов в гипертонической среде имела тенденцию к уменьшению. Это указывает на то, что клетки в гипертоническом растворе проявляют тенденцию к расплыванию и увеличению площади, но не объема.

Цитоскелет гемоцитов имеет центральную уплотненную область, которая соответствует ядерной области и расстилающуюся от нее сеть фибрилл цитоплазматической области. На сканах область ядра выглядела не разрушенной и возвышалась на 0,7-1,5 мкм над поверхностью. Остальная часть клетки сильно расплывалась по подложке и возвышалась над ней на 400 нм (Рис. 1.).

Фибриллы цитоскелета некоторых клеток расходятся от ядерной области радиальными кольцами, у других клеток цитоплазматическая область имеет однородное распределение элементов цитоскелета. Мы это связываем с различным состоянием клеток в момент фиксации.

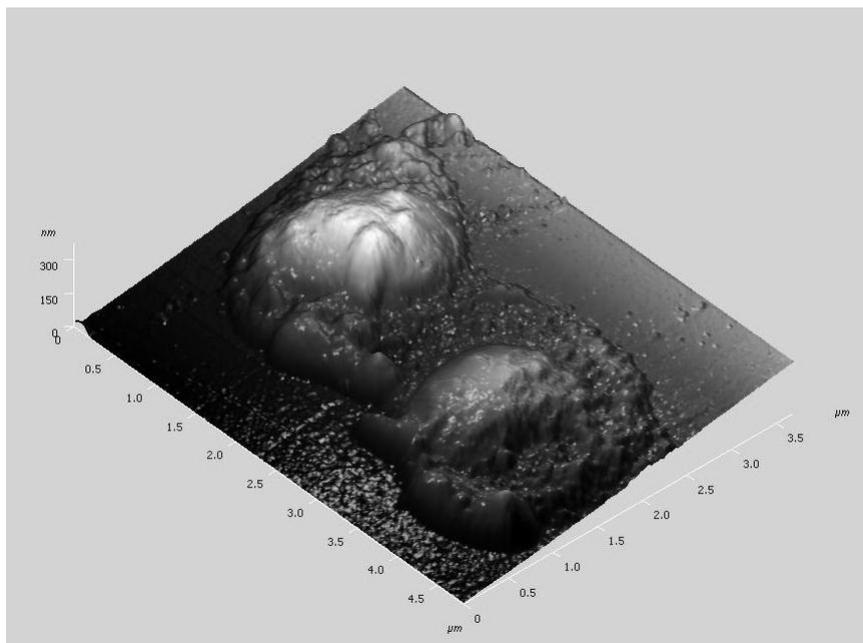


Рис. 1. Цитоскелет целомочитов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*)

Структура цитоскелета не претерпела значительных изменений после инкубации клеток в растворах различной концентрации. В гипертонической среде не было обнаружено структур цитоскелета, которые бы способствовали уплощению клеток.

При измерении такого показателя как упругость клеточных мембран, данные обрабатывали отдельно для центральной части клетки и периферической. Наибольший вклад в значение этого показателя вносит упругость подмембранных структур цитоскелета (Дерябин, 2005). Значения модуля Юнга значительно различались даже в пределах одной клетки, и не имели зависимости от локализации точек идентифицирования. Так показатель упругости для центральной и периферической частей клеток равен соответственно: в гипертонической среде – $24,83 \pm 2,68$ кПа и $22,1 \pm 7,9$ кПа; в гипотонических условиях – $18,8 \pm 6,48$ кПа и $17,93 \pm 4,48$ кПа; в изотонической среде – $18,79 \pm 5,42$ кПа и $19,35 \pm 6,3$ кПа. Показатели модуля Юнга значимо не изменялись после инкубации клеток в растворах различной концентрации, поэтому мы считаем, что целостность цитоскелета не нарушается, при адаптации клеток к изменению осмотического давления, несмотря на значительные изменения микрорельефа поверхности.

Можно предположить, что изменение осмотического давления оказывает влияние на способность клетки к выпячиванию филоподий и адгезии к подложке. Поэтому высота клеток имеет четкую корреляцию с изменением солёности растворов. Остальные же параметры показательны только для гипотонической среды, где клетки значительно увеличились в размерах.

Таким образом, не было зафиксировано изменений общей структуры цитоскелета и упругостных показателей мембраны целомочитов *Hirudo medicinalis* в условиях изменения осмотического давления. Поэтому необходимо дальнейшее изучение механизмов адаптации целомочитов в условиях меняющегося осмотического давления с применением дополнительных методов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта НИУ БелГУ ВКАС – 14 – 12.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дерябин Д. Г. Функциональная морфология клетки: учебное пособие. М.: КДУ, 2005. 320 с.
2. Berdyyeva T., Woodworth C.D., Sokolov I. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope // Ultramicroscopy. 2005. Vol. 102. P. 189–198
3. Dietz T. H., Alvarado R. H. Osmotic and ionic regulation in *Lumbricus terrestris* L. // Biol. Bull. 1970. 138. P. 247 – 261.

4. Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes in response to osmotic stress/ M. R. Kasschau, T. D. Ngo, M.L. Sperber, K.L. Tran // *Zoology*. 2007. V.110. P. 66–76.

THE IMPACT OF THE CHANGE OF OSMOTIC PRESSURE ON THE STRUCTURE OF COELOMOCYTES OF THE MEDICINAL LEECH (*HIRUDO MEDICINALIS*)

Pigaleva T. A.

We describe the effect of a change in osmotic pressure on some of the structural characteristics of the coelomocytes of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. Application of atomic force and light microscopy was used to estimate the linear parameters and the elastic characteristics of the cell membranes of coelomic fluid and the structure of the microrelief and the cytoskeleton. The data, which allows cells to share a strategy of adaptation to survival in the hypertonic and hypotonic medium.

АДАПТАЦИЯ СОМА ОБЫКНОВЕННОГО (*Silurus glanis* L.) К УСЛОВИЯМ ВЫРАЩИВАНИЯ И ДОМСТИКАЦИИ В УПРАВЛЯЕМЫХ ПРУДОВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ

Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин², А.Б. Петрушин¹, В.А. Петрушин¹

¹Государственное научное учреждение научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства россельхозакадемии, московская обл., пос. Воровского, 142460, россия, e-mail: gidrobiont4@yandex.ru

²Государственное учреждение научный центр биомедицинских технологий рамн, московская обл., красногорский р-н 143442, россия. E-mail: ar_info@mail.ru

Сом обыкновенный – хищник, является биологическим мелиоратором, так как уничтожает большую и сорную рыбу. Его мясо обладает высокими вкусовыми свойствами. В карповых рыбоводных хозяйствах с недавнего времени его разводят как дополнительную культуру. В условиях культивирования рыбы подвергаются стресс-факторам, в частности хендлинговым операциям, искусственным условиям зимовки и др. Поэтому для успешной домстикации сома необходимо выявить его адаптационные возможности с учетом сезона года, пола, стадии онтогенеза.

У рыб, по мнению Б.Н. Казанского (1975), очень надежно осуществляется синхронизация размножения с сезонной цикличностью природы и адаптация к не периодичным сезонным сдвигам. Например, с началом генеративного синтеза и по мере возрастания его интенсивности происходит замедление, а затем и полное прекращение процессов белкового роста и жиронакопления в мышцах и полости тела. Во время созревания гонад количество альбуминов в крови значительно снижается (Кирсипуу, 1981). Однако содержание белка в печени самок во время вителлогенеза увеличивается за счет активного синтеза оовителлина из поступающих в печень продуктов распада белковых комплексов мышц, при этом возрастает содержание нуклеиновых кислот (Ипатов, 1982).

Известно, что показатели крови отражают адаптационные свойства организма. Пониманию механизмов адаптации к условиям существования способствует изучение гематологических показателей рыб, выращиваемых при различном уровне интенсификации, а также рыб из различных по степени антропогенного воздействия водоемов (Серпунин, 2002).

Фагоцитарную активность клеток можно оценивать по содержанию катионного белка в лизосомах. Неферментный катионный белок обеспечивает цитотоксичность клеток и свидетельствует об их способности к фагоцитозу (Пигаревский, Мазинг, 1981). Катионные белки, содержащиеся в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов и макрофагов, обеспечивает высокую бактерицидную активность в синергическом взаимодействии с системой миелопероксидаза – H_2O_2 . Катионный белок повышает проницаемость сосудов микроциркулярного русла, а также стимулирует хемотаксис моноцитов, инициирует миграцию гранулоцитов. В процессе изучения свойств катионных белков нейтрофилов в условиях фагоцитоза и воспаления было выяснено, что эти белки не только обладают противомикробной

активностью, но и регулируют множество защитно-адаптационных реакций, ответственных за развитие неспецифической резистентности человека и животных (Kokriacov, 1990).

Настоящему исследованию подвергались сомы сурской популяции, выращиваемые в СХПРК «Киря» и волжской популяции, культивируемые в хозяйствах Волгоградской области: СПК «Ергенинский» и ООО «Флора».

Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены с соблюдением правил асептики. Определялся комплекс показателей, предложенный Г.И. Прониной для оценки рыб (2012). Данный комплекс включает показатели: гематологические (эритропоз и лейкоцитарную формулу), биохимические (активность некоторых ферментов и содержание белка, альбуминов, глюкозы и др. в сыворотке крови) и иммунологические (фагоцитарная активность по среднему цитохимическому коэффициенту содержания неферментного катионного белка в нейтрофилах крови по М.Г. Шубичу, 1974).

Проведенные исследования позволили выявить изменчивость гематологических, биохимических и иммунологических показателей сома обыкновенного при выращивании и доместикации в условиях рыбоводных хозяйств в разные сезоны года.

Сом обыкновенный относится к теплолюбивым рыбам. Поэтому гораздо интенсивнее растет в условиях пятой рыбоводной зоны (Волгоградская область), чем во второй (Чувашия). В Волгоградском хозяйстве у сома в лейкоцитарной формуле отсутствуют бластные формы гранулоцитов, тогда как в «Кире» у самцов и самок присутствует определенный процент метамиелоцитов, и миелоцитов (табл. 1). Такая активация лейкопоза у сома весной, вероятно, связана с влиянием резких температурных перепадов, характерных для климата Чувашии. Кроме того, производители сома из СХПРК «Киря» впервые созрели для нереста.

Таблица 1. Морфометрические, гематологические и цитохимические показатели производителей сома обыкновенного

| Показатели | СХПРК «Киря», 2 зона рыбоводства | | Р/х «Флора», 5 зона рыбоводства | |
|---|-------------------------------------|-----------|------------------------------------|------------|
| | Самцы | Самки | Самцы | Самки |
| Масса, г | 2630±178* | 2500±141* | 3340±120* | 3517±392* |
| Длина тела, см | 83±1,0 | 74±1,1 | 77±1,2 | 75±2,1 |
| Эритропоз, % | | | | |
| Гемоцитобласты, эритробласты | 0,7±0,4 | - | 1,0±0,7 | 1,0±0,7 |
| Нормобласты | 2,7±0,4 | 3,0±1,4 | 2,3±0,4 | 4,7±0,4 |
| Базофильные эритроциты | 11,7±4,0 | 7,5±0,7 | 12,3±1,8 | 14,0±4,6 |
| Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов | 85,0±4,4 | 89,5±2,1 | 84,3±2,7 | 80,3±4,8 |
| Лейкоцитарная формула, % | | | | |
| Миелоциты | 0,5±0,4 | 1,0±0,4 | - | - |
| Метамиелоциты | 3,0±1,4 | 3,5±0,7 | - | - |
| Палочкоядерные нейтрофилы | 0,7±0,8 | 1,5±2,1 | 1,0±0,7 | 3,3±1,6 |
| Сегментоядерные | 4,3±0,8 | 4,5±2,1 | 3,7±1,1 | 4,0±1,2 |
| Всего нейтрофилов | 5,0±1,4 | 6,0±4,2 | 4,7±0,4 | 7,3±0,4 |
| Базофилы | 0,3±0,4 | - | - | - |
| Моноциты | 3,3±2,0 | 2,5±0,7 | 2,0±0,7 | 2,7±1,1 |
| Лимфоциты | 88,3±2,3 | 87,0±2,8 | 93,0±1,2 | 90,0±0,7 |
| Фагоцитарная активность | | | | |
| СЦК | 1,30±0,15* | 1,72±0,51 | 1,81±0,20 | 1,90±0,19* |

Примечание: здесь и далее * различия достоверны

Уровень активности эритропоэза был одинаков у рыб, как второй, так и пятой зоны рыбоводства и находился в пределах, свойственных здоровым особям этого вида с хорошей жизнеспособностью и стабильной кроветворной системой. У производителей, особенно у самок, наблюдалось увеличение количества незрелых эритроцитов в периферической крови. По-видимому, их повышенное образование в весенний период компенсирует затраты на усиленный кислородный обмен при выработке половых продуктов.

Количество неферментного катионного белка в лизосомах нейтрофилов периферической крови сома обыкновенного в пятой зоне рыбоводства было несколько больше, чем во второй, климатические условия которой вызывают повышенный расход лизосомального протеина при адаптации к влиянию абиотических факторов среды. Об этом же свидетельствует менее интенсивный рост рыб второй зоны. Тем не менее, получены хорошие результаты по выращиванию сома обыкновенного в карповых рыбоводных хозяйствах второй зоны рыбоводства.

По мере роста рыбы происходят изменения гематологической картины крови сома, связанные с физиологическими процессами: ростом, созреванием гонад. Кровь у рыб отбиралась в одно и то же время осенью, что позволяет нам сравнить разновозрастные группы сомов рыбоводного хозяйства ООО «Флора» (табл. 2). Наиболее интенсивно гемопоэз протекает у годовиков, несмотря на осенний период. Усиление эритропоэза годовиков сома связано с ростом, который продолжается у молоди сома несколько дольше, чем у карпа. Рост двухгодовиков осенью замедляется. То же можно сказать и о производителях после нереста. Усиление лейкопоэза осенью отмечено нами и у карпа. Возможно из-за необходимости усиления иммунной защиты при подготовке к зимовке, когда происходит торможение обменных процессов в организме рыб.

Таблица 2. Гематологическая характеристика сома обыкновенного в онтогенезе

| Показатели | Годовики | Двухгодовики | Производители | |
|---|-----------|--------------|---------------|-----------|
| | | | Самцы | Самки |
| Эритропоэз, % | | | | |
| Гемоцитобласты, эритробласты | 1,3±0,3 | 0,5±0,7 | 1,0±0,7 | 1,0±0,7 |
| Нормобласты | 6,7±0,9 | 2,5±0,7 | 2,3±0,4 | 4,7±0,4 |
| Базофильные эритроциты | 15,7±2,3 | 5,5±2,1 | 12,3±1,8 | 14±4,6 |
| Сумма зрелых и полихроматофильных эритроцитов | 76,3±2,2 | 91,0±2,8 | 84,3±2,7 | 80,3±4,8 |
| Лейкоцитарная формула, % | | | | |
| Миелобласты | - | - | - | - |
| Промиелоциты | - | - | - | - |
| Миелоциты | 1,0±0,6 | - | - | - |
| Метамиелоциты | 2,3±0,3 | - | - | - |
| Палочкоядерные нейтрофилы | 2,7±0,7 | 1,4±0,7 | 1,0±0,7 | 3,3±1,6 |
| Сегментоядерные | 2,7±0,7 | 8,0±0,0 | 3,7±1,2 | 4,0±1,2 |
| Всего нейтрофилов | 5,3±0,7 | 11,5±0,7 | 4,7±0,4 | 7,3±0,4 |
| Эозинофилы | 0,7±0,3 | - | - | - |
| Базофилы | 0,7±0,3 | - | - | - |
| Моноциты | 2,0±0,9 | 3,5±4,9 | 2,0±0,7 | 2,7±1,1 |
| Лимфоциты | 88,0±1,0 | 85,0±4,2 | 93,0±1,2 | 90,0±0,7 |
| Фагоцитарная активность | | | | |
| СЦК | 1,80±0,10 | 2,09±0,23 | 1,80±0,20 | 1,91±0,19 |

Установлено, что в Чувашии скорость роста сомов на третьем году выше, чем в Волгоградской области, несмотря на более комфортные условия последней. Это объясняется тем, что во второй зоне рыбоводства созревание сомов наступает гораздо позже, чем в пятой. А

основной рост рыб приходится на период до их созревания. Как во второй, так и в пятой зоне рыбоводства определены факторы, обеспечивающие оптимальные условия для роста и развития сомов. Это наличие доступной пищи, укрытий, плотность посадки, температура, длительность фотопериода.

Годовики отличаются присутствием в крови эозинофилов и базофилов. Кроме возрастных особенностей имеет место созревание гонад и подготовка производителей к нересту. Наибольший уровень потенциала фагоцитарной активности по цитохимическому коэффициенту содержания катионного белка в нейтрофилах крови отмечен у двухгодовиков.

Биохимия сыворотки крови молоди сома обыкновенного из разных хозяйств показала высокий уровень активности трансаминаз (табл. 3). Уровень активности аланинаминотрансферазы свидетельствует о высоком потенциале роста рыб. У двухлетков сома СПК «Ергенинский» отмечено очень низкое значение аспаратаминотрансферазы. Молодь сома из этого хозяйства значительно опережает по массе и, соответственно по скорости роста, одновозрастные группы из других рассматриваемых нами хозяйств. Активность ГГТ крови молоди сома из хозяйств Волгоградской области почти в два раза превышает таковую в «Кире». У сеголетков из «Ергенинского» по сравнению с сеголетками из «Кири» различия достоверны при $t=4,17$. Одной из причин усиления активности фермента является интенсивный рост рыб, при котором выбрасывается большое количество продуктов метаболизма. Соответственно происходит нагрузка на печень. Источником сывороточной ГГТ, как правило, является гепатобилиарная система. Данное повышение активности ГГТ не связано с остеосинтезом, так как активность ЩФ не увеличилась (при нарушениях остеосинтеза одновременно повышается активность ГГТ и ЩФ). Напротив, у молоди сома обыкновенного из СПК «Ергенинский» активность ЩФ была почти в два раза ниже, чем у одновозрастных групп из СХПРК «Киря»; для сеголетков различия достоверны ($t=3,89$).

Уровень глюкозы в сыворотке крови исследуемой молоди сома обыкновенного был невысоким. По-видимому, осенью при подготовке к зимовке происходит накопление гликогена в печени как энергетического резерва. Свидетельством этого являются высокие показатели лактатдегидрогеназы, участвующей в процессах гликолиза.

Таблица 3. Биохимическая характеристика крови молоди сома

| Показатели | «Киря» | | «Ергенинский» | | «Флора» |
|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| | Сеголетки | Двухлетки | Сеголетки | Двухлетки | Двухлетки |
| Масса тела, г | 78±7 | 590±37 | 322±206 | 1356±109 | 1059±8 |
| АЛТ, ед/л | 47,0±10,0 | 27,7±2,2 | 28,8±2,4 | 29,4±1,5 | 32,8±2,9 |
| АСТ, ед/л | 571±42 | 554±26 | 557±9 | 39±2 | 547±5 |
| ГГТ, ед/л | 2,3±0,3* | 4,5±1,7 | 8,5±1,5* | 9,50±1,8 | 5,84±2,5 |
| Глюкоза, ммоль/л | 2,3±0,7 | 3,2±0,4 | 2,0±0,1 | 4,7±0,48 | 3,7±0,4 |
| КК, ед/л | 3532±426 | 1956±636 | 3411±604 | 1886±405 | 1339±442 |
| Креатинин, мкмоль/л | 7,7±5,4 | 1,4±0,7 | - | 9,2±3,6 | 6,1±3,7 |
| ЛДГ, ед/л | 369±161 | 624±115 | 734±231 | - | 293±146 |
| Лактатат, мг/дл | 34,1±8,2 | 31,5±6,4 | 26,1±3,9 | 81,1±10,8 | 43,6±6,1 |
| ЩФ, ед/л | 30,3±1,3* | 20,6±4,9 | 12,8*±4,3 | 15,0±1,9 | 20,2±6,3 |
| Альбумин, г/дл | 10,0±0,8 | 11,9±0,4 | 9,3±0,4 | 11,4±0,2 | 10,6±0,2 |
| Амилаза, ед/л | 5,2±2,3 | 7,2±2,6 | 11,8±4,6 | 8,2±1,7 | 5,8±1,9 |
| Общий белок, г/л | 21,7±1,8 | 28,5±0,9 | 21,58±1,0 | 24,0±0,5 | 24,2±0,5 |
| Панкреатическая амилаза, ед/л | 5,2±2,1 | 7,3±1,7 | 13,7±7,8 | 7,28±1,8 | 13,68±1,5 |
| Триглицериды, мг/дл | 413±107 | 758±79* | 299±78 | 168±23* | 336±52* |
| Холестерин, мг/дл | 275±20 | 255±25 | 127±18 | 190±7 | 508±376 |

Жировой обмен у сомов происходит по-разному в разных хозяйствах. Наиболее интенсивное накопление резерва у молоди сома в «Кире», особенно у двухлеток: содержание триглицеридов у них выше по сравнению с двухлетками «Ергенинского» ($t=7,11$) и по сравнению с одновозрастной группой из «Флоры» ($t=7,45$). Отмечен высокий показатель холестерина у двухлеток из «Флоры», что также свидетельствует об интенсивном жировом обмене.

Таким образом, сом обыкновенный обладает достаточным резервом, позволяющим ему адаптироваться к условиям культивации и одомашнивания. Что делает возможным проводить его селекцию по зоотехническим и физиологическим показателям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ипатов В.В. Динамика содержания нуклеиновых кислот в тканях балтийской трески как показатель интенсивности процессов роста // Рыбохозяйственные исследования в бассейне Балтийского моря. Рига. 1982. Вып. 17. С. 107-112.
2. Казанский Б.Н. Закономерности гаметогенеза и экологическая пластичность размножения рыб // Сб.: Экологическая пластичность половых циклов и размножение рыб. – Л.: Изд. Ленинградского Ун-та, 1975. С.3-32
3. Кирсипуу А. Белковый спектр сыворотки крови сома // Сб. гидробиол. Исслед. Тарту: Гос. Ун-т, №10, 1981. С. 138-140.
4. Пигаревский В.Е., Мазинг Ю. А. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике // Лабораторное дело, 1981, № 10. С. 579—582.
5. Пронина Г.И. Физиолого-иммунологическая оценка культивируемых гидробионтов: карпа, сома обыкновенного, речных раков // Диссертация доктора биол. наук. Москва, 2012. 246с.
6. Серпунин Г.Г. Гематологические показатели адаптаций рыб / Автореф. докт. биол. наук. Калининград, 2002. – 49 с.
7. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология, 1974, N 10. С. 1321-1322.
8. Kokriacov V.N. Lysosomal cationic proteins in neutrophilic granulocytes during phagocytosis and inflammation. Vopr Med Khim. 1990. 36 (6). P. 13-16.

ADAPTATION OF THE CATFISH EUROPEAN (*Silurus glanis* L.) TO CONDITIONS OF CULTIVATION AND DOMESTICATION IN OPERATED POND FARMS

G.I.Pronina, A.O.Revyakin, A.B.Petrushin, V.A.Petrushin

Research of a catfish European, grown up in fish-breeding farms of the second and fifth zones of fish breeding is carried out. The range of physiological variability and adaptable possibilities of a catfish on hematology, biochemical and cytochemical indicators is estimated.

РЫБЫ КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЭКОСИСТЕМ

Решетников Ю.С., Попова О.А.

Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н.Северцова РАН, Москва

E-mail: ysreshetnikov@gmail.com

В связи с усилением влияния хозяйственной деятельности человека на наземные и пресноводные экосистемы насущными проблемами во всем мире стали загрязнение больших территорий промышленными и сельскохозяйственными стоками, атмосферный перенос загрязнений на большие расстояния, радиоактивное загрязнение, потеря биологического разнообразия. Во многих пресноводных экосистемах наблюдаются сукцессионные изменения в структуре рыбного населения. Особую тревогу вызывает состояние водоемов в промышленных зонах, где кумулятивный эффект всех видов загрязнений наиболее велик. Здесь наблюдаются большие сукцессионные изменения водных экосистем вплоть до полного уничтожения многих живых существ.

Проблемы оценки состояния и устойчивости экосистем могут решаться на разных уровнях. Мы исходили из того, что само состояние гидробионтов может служить обобщенным показателем степени экологического благополучия водоема (Попова и др., 1997; Решетников и др., 1999; Reshetnikov et al., 2002 и др.). Рыбы, как последнее звено в трофической цепи

водоемов, в ряде случаев представляют собой хорошие тест-объекты. Есть несколько подходов к оценке воздействия токсикантов на рыб (Флеров, 1989; Захаров, Кларк, 1993; Кашулин, Решетников, 1995; Решетников, 1995; Попова и др., 1997; Решетников и др., 1999; Amundsen at al., 1997; Reshetnikov at al., 2002 и др.). В последние годы нами разрабатывались новые подходы к оценке состояния водных экосистем: это метод экспертной оценки состояния особей и популяций, метод оценки состояния экосистем по уровню их биологического разнообразия и метод фазовых портретов. В данном сообщении остановимся только на первом методе.

Метод экспертной оценки был использован нами для выявления зон экологического кризиса и экологического бедствия в районах сильного промышленного загрязнения (Решетников, Попова, 1995; Решетников и др., 1999; Amundsen at al., 1997; Reshetnikov at al., 2002). Наши исследования проводились на водоемах Кольского п-ова, для которых наибольшую опасность представляют комбинаты "Северо-никель", "Печенганикель" и "Апатит". Мониторинговые работы проводились с 1991 по 2008 гг на водоемах в системе реки Пасвик и в бассейне озера Имандра (Мурманская область), расположенных на разном расстоянии от источника загрязнения.

Метод основан на массовом патологоанатомическом анализе отдельных особей рыб и определения степени поражения жизненно важных органов и всего организма в целом. Все изменения во внешней морфологии контролировались определением концентрации тяжелых металлов в органах и тканях рыб (Кашулин, Решетников, 1995; Amundsen at al., 1997), а визуальная регистрация изменений в репродуктивной системе дополнялась гистологическим анализом (Решетников и др., 2000). На основе балльной системы оценок аномалий предложен новый интегрированный Индекс Неблагополучного Состояния (ИНС), который в виде одного числа выражает состояние особи. Метод объединяет в себе патолого-анатомические, морфометрические, экологические и некоторые физиологические показатели рыб. Предлагаемый метод прост и может быть широко использован в обычных ихтиологических исследованиях при контроле изменений в естественных экосистемах при любых видах антропогенного воздействия. Показано, что самцы и самки различных видов рыб (сиг, окунь, щука) по этому показателю практически не различаются, но он выше у старых рыб, поскольку с возрастом происходит накопление в организме рыб вредных веществ и разного рода аномалий. ИНС отдельных популяций различается в зависимости от степени загрязнения водоема и хорошо коррелирует с содержанием тяжелых металлов в теле рыб. Наблюдается четкое увеличение ИНС по мере приближения к источнику загрязнения.

Основными «воротами» попадания в организм рыбы вредных веществ и местами их накопления являются системы: дыхательная (жабры), пищеварительная (желудочно-кишечный тракт, печень и желчный пузырь), выделительная (почки) и воспроизводительная (гонады). Как показали наши исследования, в первую очередь при сильном загрязнении страдают жабры, печень и почки.

Прежде всего резко меняется цвет **жабр** у рыб. Жабры у свежепойманных рыб в норме имеют равномерную темно-вишневую окраску. В начальной стадии токсикоза их цвет меняется до бледно-розового, увеличивается количество слизи. Более глубокие поражения вызывают гиперемия, ярко выраженную синюшность, ослизнение, на лепестках вдоль жаберной дуги появляется голубое анемичное кольцо; ярко выраженное анемичное кольцо в дальнейшем сопровождается некрозом жабр. Со временем меняется и форма **жаберных тычинок**: некоторые из них раздваиваются, другие погибают на конце, отмечен также неровный ряд тычинок и их укорочение; при сильном поражении рыб часть тычинок редуцируется, а в ряду тычинок появляются пропуски.

Печень у сига и окуня в норме имеет темно-вишневый цвет с небольшими вариациями в оттенках. Аномалии печени проявляются в изменении ее цвета, размера, формы и структуры. На ранних стадиях токсикоза печень становится пятнистой или мозаичной. Отмечалась полная гамма оттенков - от красного до песочного и рыжего. Размер печени и ее форма также претерпевают сильные изменения. У сига и щуки печень уменьшается, укорачивается и истончается, изредка образуются отдельные доли. У окуня и налима печень по форме напоминает перчатку, она истончается до такой степени, что превращается в тонкую полупрозрачную пластинку с несколькими лопастями, внутри которых четко видна сеть сосудов. Часто обнаруживаются признаки цирроза печени, в этом случае печень приобретает

рыжий цвет и зернистую структуру. На последних стадиях поражения печень становится очень дряблой по консистенции и легко размазывается при надавливании.

Почки на загрязнение среды прежде всего реагируют изменением цвета, они становятся сине-зелеными или бурыми, затем появляются соединительно-тканые разрастания, прежде всего в хвостовой части, почечная ткань приобретает зернистую структуру. В дальнейшем они теряют свою однородность, поражение охватывает весь орган. При надавливании на почку под пальцами ощущаются мелкие песчинки, что свидетельствует о начальной стадии нефрокальцитоза. Нефрокальцитоз - наиболее часто встречаемое заболевание почек рыб в районе воздействия стоков медно-никелевого производства (поражено до 80% сигов). При развитии этой болезни в среднем и заднем отделах почки наблюдается значительное расширение протоков и в них обнаруживаются камни диаметром до 5 мм. Камней может быть много, а объем почки при этом соответственно увеличивается. При сильной закупорке протоков наблюдается водянка почки.

Морфологические аномалии. В сильно загрязненных водоемах (Куетсиявр) нами наблюдались многочисленные случаи аномального развития плавников, костей черепа, позвонков (изгибы и сращения позвонков). У рыб наблюдается снижение мышечного тургора за счет разложения соединительно-тканых перегородок между сегментами мускулатуры (миопатия). Подобное явление отмечали у всех видов рыб в окрестностях г.Никеля. На первых стадиях заболевания тело становится дряблым даже у живых рыб. При более глубоком поражении организма при слабом надавливании на теле остаются вмятины, а при максимальном токсикозе мышцы легко отделяются от костей и распадаются на отдельные миосепты. Иногда в мышцах встречаются свищи и пустоты. У щуки и окуня в наиболее загрязненных водоемах мышцы бывают окрашены в голубой или зеленоватый цвета.

Аномалии, связанные с миопатией, отмечались у рыб разного возраста. Они могли появляться и в последние годы жизни рыбы. Сращание же и разрушение отдельных позвонков, скорее всего, обусловлены воздействием токсикантов на молодь в период их эмбрионального развития.

При высоких концентрациях металлы в большинстве случаев становятся токсичными, причиняют вред организму рыб, вызывая морфологические аномалии и/или функциональные нарушения и, в конечном итоге, могут привести к смерти особи. Механизмы подобных явлений на молекулярном уровне состоят в том, что токсичный металл вытесняет или заменяет обычный металл из состава молекулы, приводит к неправильному связыванию оснований нуклеотидов и нарушениям в белковом синтезе; происходит деполимеризация биологически важных макромолекул и образование биологически вредных для организма агрегатов и других соединений. При этом страдают все функционально-важные органы, в том числе и система воспроизводства.

Воспроизводительная система также имеет целый ряд патологических изменений, которые диагностируются визуально и при гистологическом исследовании. Основные аномалии в системе воспроизводства у рыб могут быть суммированы следующим образом:

- 1) Изменялась форма гонад (асимметрия гонад, крайний вариант - наличие лишь одной гонады; гонады у самцов с перетяжками, у самок – дольчатые или с перетяжками; гонады срастаются между собой или прирастают к кишечнику; гонады не имеют выходного отверстия из полости тела).
- 2) Менялся цвет гонад и половых клеток.
- 3) Отмечены нарушения в структуре ткани гонад (жировое перерождение ткани гонад; появление новообразований в ткани гонад; замена части гонад соединительно-ткаными образованиями).
- 4) Визуально регистрировались нарушения в синхронности развития гонад (семенник в передней части на II стадии, в средней части - на III-IV, в конце - на V стадии развития; гонады у созревающих самцов на III-IV стадии в 2-4 раза меньше нормы; частичная или полная резорбция яйцеклеток; после окончания нереста в гонадах остается много невыметанных половых продуктов).
- 5) Появление интерсексуальных особей (даже визуально отмечены гермафродиты у сига и налима, а в районе Норильского комбината – и у других видов рыб: ряпушки, муксуна, чира и гольца. Гистологический анализ показал увеличение количества гермафродитных особей на порядок по сравнению с визуальной оценкой) (Чеботарева и др., 1997; Решетников и др., 2000).

На основании оценки состояния рыб в водоемах системы р.Пасвик и данных о концентрации никеля в среде и в рыбах выделены три экологические зоны, которые имеют следующие характеристики.

1) ЗОНА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КРИЗИСА. Содержание никеля в воде достигает 30-35 мкг/л (вдвое выше критической) и в седиментах - более 10 мкг/л. Здесь наблюдаются максимальные концентрации тяжелых металлов в органах рыб и максимальные отклонения от нормы по всем морфо-патологическим показателям у рыб. Особенно сильно и практически у всех особей поражены печень и почки, отмечены случаи гибели рыб. Значения ИНС у сига в этой зоне колеблются от 5 до 20, составляя в среднем 10-15 для разных популяций; у окуня - 12-17 и у щуки - 15-19. Этот район в виде кольца радиусом 10-15 км охватывает источник загрязнения. Интересно подчеркнуть, что рыбы в зоне экологического кризиса имеют минимальное количество паразитов (последние тоже погибают в плохих условиях обитания). Из водоемов этой зоны рыбу нельзя употреблять в пищу (как грибы и ягоды), особенно в летние и осенние месяцы, возможны случаи отравления рыбой. В этих водоемах следует вообще запретить лов рыбы для употребления её в пищу.

2) ЗОНА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО БЕДСТВИЯ охватывает район, находящийся на расстоянии от 10 до 30 км от источника загрязнения, здесь концентрация никеля в воде достигает 5-30 мкг/л и в седиментах - 5-10 мкг/л. Значения ИНС колеблются от 5 до 13 и составляют в среднем 5-7 у сига, 8-13 - у хищников. Рыбы ослаблены, обильно заражены паразитами, часто нарушена система детоксикации (жабры, почка, печень) и воспроизводительная система. Здесь происходит накопление тяжелых металлов во внутренних органах рыб, и минимальные концентрации наблюдаются в мышцах, поэтому рыбу можно употреблять в пищу только в виде филе, тщательно удаляя чешую, кожу, жабры и все внутренние органы. Промысел рыбы желательно перенести на весенние месяцы.

3) ЗОНА ОТНОСИТЕЛЬНОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ располагается более чем в 30 км от источника загрязнения, концентрации никеля в воде и седиментах не превышают 5 мкг/л. Аномалии встречаются, но не у всех рыб и не во всех органах. Значения ИНС колеблются от 0 до 10, составляя в среднем 0-3 у сига и 0-8 - у хищников. Зараженность паразитами обычная. В относительно чистых районах возможно употребление рыбы в пищу, но только в виде филе; здесь может существовать нормальный промысел рыбы.

Наши исследования последних лет (2002-2008 гг) на водоемах реки Пасвик в загрязненном районе около Никеля и Печенги показали, что по сравнению с началом 1990-х годов значительно снизилась пораженность рыб в результате токсикации тяжелыми металлами. Исчезли явные признаки миопатии, совсем не встречается нефрокальцитоз (отложение камней в почках рыб). По-прежнему сохраняются многие другие виды поражений, свидетельствующие о неблагополучном состоянии рыб, но степень поражения органов и тканей стала значительно меньше. По сравнению с максимально плохой экологической ситуацией в 1990-1993 гг отмечается некоторое улучшение общей экологической ситуации в 2002-2008 гг (Решетников, 2004). Прежде всего это связано со снижением промышленной нагрузки на водоемы бассейна р.Пасвик, в частности с улучшением системы очистки промышленных стоков от тяжелых металлов и переходом медно-никелиевого комбината на обработку только своей руды, в которой гораздо меньше серы, чем в руде, привозимой ранее из Норильска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Захаров В.М., Кларк Д.М. (ред.). Биотест: интегральная оценка здоровья экосистем и отдельных видов. М.:Моск. Отд-ние междунар. фонда "Биотест". 1993. 68 с.
2. Кашулин Н.А. Решетников Ю.С. Накопление и распределение никеля, меди и цинка в органах и тканях рыб в Субарктическом водоеме // Вопр. ихтиологии, 1995. Т. 35, № 5. С. 687-697.
3. Попова О.А., Решетников Ю.С., Терещенко В.Г. Новые подходы к мониторингу биоразнообразия водных экосистем //Мониторинг биоразнообразия. М.: ИПЭЭ РАН. 1997. С. 269-277.
4. Решетников Ю.С. Современные проблемы изучения сиговых рыб // Вопр. ихтиологии, 1995. Т. 35, № 2. С. 156-174.
5. Решетников Ю.С. Проблема ре-олиготрофирования водоемов //Вопр. ихтиологии, 2004. Т. 44, № 5. С. 709-711.

6. Решетников Ю.С., Акимова Н.В., Попова О.А. Аномалии в системе воспроизводства рыб при антропогенном воздействии //Изв. Самарского НЦ РАН. 2000. Т. 2, № 2. С. 274-282.
7. Решетников Ю.С., Попова О.А. Оценка состояния пресноводных экосистем по состоянию рыбной части сообщества. //Проблемы экологии и рационального природопользования Северо-Запада России и Псковской области. Псков: ПГПИ. 1995. С. 41-52.
8. Решетников Ю.С., Попова О.А., Кашулин Н.А., Лукин А.А., Амундсен П.-А., Сталдвик Ф. Оценка благополучия рыбной части водного сообщества по результатам морфо-патологического анализа рыб. //Успехи соврем. Биологии. 1999. Т. 119, № 2. С. 165-177.
9. Флеров Б.А. Эколого-физиологические аспекты токсикологии пресноводных животных. Л.: Наука. 1989. 138 с.
10. Чеботарева Ю.В., Савоскул С.П., Савваитова К.А. Аномалии в строении воспроизводительной системы самок рыб норило-пясинских водоемов Таймыра // Вопр. ихтиологии. 1997. Т.37. № 2. С. 217-223.
11. Amundsen P.-A., Frode J. Staldvik, A.A. Lukin, N.A. Kashulin, O.A. Popova and Yu.S. Reshetnikov. Heavy metal contamination in freshwater fish from the border region between Norway and Russia. //The Science of the Total Environment, 1997. V. 201. P. 211-224.
12. Reshetnikov Yu.S., O.A. Popova, N.A. Kashulin, A.A. Lukin and P.-A. Amundsen. Development of an index to assess heavy metal pollution on fish populations //Advances in Limnology 57 Biology and Management of Coregonid Fishes-1999. (Arch. Hydrobiol.). 2002. V. 57. P. 221-231.

FISHES AS TEST-SUBJECT FOR ASSESSMENT OF STATE OF ECOSYSTEMS

Yu.S. Reshetnikov, O.A. Popova

A new method, based on morphological and pathological-anatomical characters, the Index of Unfavourable State (IUS) has been proposed for the expert assessment of fish health at the individual and population levels. The detoxication system of an organism is initially the most affected (gill, liver, kidney). Intensive pollution of waterbodies initially affects reproductive characteristics such as gonadal asymmetry and deterioration in the quality of sexual products, but then several other specific impacts also appear as anomalies in the fins, structure of fin spines and rays, vertebrae, kidney stones, and accumulation of toxic substances. Analysis of data from eight European whitefish (*Coregonus lavaretus*) populations and three predatory fish species (*Perca fluviatilis*, *Esox lucius* and *Lota lota*) in the Pasvik River basin revealed that the IUS index increased with the fish age and during the summer-autumn season. The index differed between waterbodies, depending on the level of pollution, and was also correlated with the concentration of heavy metals in fish tissues. Three zones based on IUS values were delineated in the Pasvik River basin including zone of ecological crisis, ecological disturbance, and relatively good condition.

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАННИХ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СТАДИЙ РЫБ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

И.И. Руднева, В.Г. Шайда

Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, Украина,

E-mail: svg@mail.ru

Антиоксидантные механизмы защиты проявляются на самых ранних этапах развития животных, в результате чего устанавливается строго определенный баланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов, включая перекисное окисление липидов (ПОЛ) и антиоксидантной активностью (АОА). Этот баланс отражает адаптационные возможности организмов к изменяющимся условиям среды и их устойчивость к действию неблагоприятных факторов, в том числе к антропогенному загрязнению. Антиоксидантный статус организма зависит как минимум от четырех факторов: строго определенной структурной организации липидов, активности антиоксидантных ферментов и ферментов, регулирующих обмен фосфолипидов клеточных мембран, а также от содержания низкомолекулярных антиоксидантов (Бурлакова, 2005).

В процессе оогенеза в ооцит поступают вителлогенин, комплекс фосфолипогликопротеинов с молекулярной массой 300–600 kDa в результате микропиноцитоза, тогда как липиды, каротиноиды, гликопротеины, витамин-связывающие

белки, гормоны и РНК попадают с кровью материнского организма (Mommsen & Walsh, 1988). Эти компоненты имеют важное значение не только для энергетического обеспечения и ферментативной активности развивающегося эмбриона, но и для контроля трансляции мРНК в ооците после его оплодотворения.

Образование свободных радикалов происходит уже в оплодотворенной икре рыб и затем усиливается в процессе развития эмбрионов и особенно у вылупившихся личинок. Предполагают, что в оплодотворенном яйце существует самостоятельная НАДН-зависимая система, генерирующая свободные радикалы и выполняющая соответствующие функции в отсутствие иммунной системы на ранних стадиях развития организма (Kadomura et al., 2006). Нами показано, что в процессе эмбриогенеза у рыб наблюдается существенное увеличение теплопродукции, достигающее максимальных величин на стадиях формирования органов, глаз и плавников (Рис. 1).

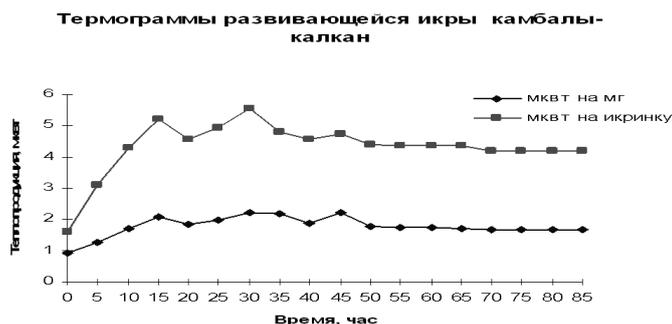


Рис. 1. Динамика теплопродукции развивающихся эмбрионов черноморской камбалы-калкан *Psetta maxima maetotica*.

В этот же период отмечены максимальные величины параметров ПОЛ (Рис. 2). Совершенно очевидно, что интенсификация процессов ПОЛ в развивающихся эмбрионах рыб связана с активацией обмена, усилением потребления кислорода и сменой энергетических субстратов в ходе развития. К концу эмбриогенеза перед вылуплением и у личинки содержание продуктов ПОЛ падает. Это может быть связано с тем, что ТБК-реактивные компоненты локализуются в основном не в теле развивающегося зародыша, а в хорионе и (или) перивителлиновой жидкости, куда продукты ПОЛ удаляются из эмбриона перед вылуплением личинки. По этой причине сокращение уровня ПОЛ в ходе личиночного развития может отражать либо усиленное их выведение, либо увеличение активности антиоксидантных ферментов к концу эмбриогенеза, что было отмечено многими исследователями (Peters, Livingstone, 1996; Rudneva, 1999; Mourente et al., 2000; Sole et al., 2004).

Низкомолекулярные антиоксиданты играют важную роль в процессе гаметогенеза рыб, так как развитие гонад стимулирует гонадотропин, непосредственно взаимодействующий с катехоламинами и стероидными гормонами и их рецепторами, который регулирует механизм поглощения антиоксидантов (аскорбата), их транспорт и метаболизм (деградацию и синтез) в репродуктивной системе. Витамин Е, каротиноиды и витамин А – важнейшие компоненты икры, от которых зависит успешное развитие эмбриона и личинки.

Низкомолекулярные антиоксиданты являются необходимыми составляющими пищи рыб, поскольку они играют важнейшую роль в успешной репродукции. Значение антиоксидантов определяется: 1. их защитной антиоксидантной функцией в отношении ДНК, содержащейся в гаметах, против повреждающего действия естественных метаболитов и экзогенных веществ, особенно после вылупления личинки (экзогенный стресс); 2. их поглощением из пищи взрослых особей и транспортом в гаметы для успешного обеспечения репродукции; 3. участием в эндокринной регуляции нейрогуморально-гуморальных путей репродукции и 4. участием в регуляции созревания и(или) стерильности при высоких дозах УФ-радиации, а также в условиях гипоксии, гипероксии, прооксидантно-антиоксидантных состояниях (Dabrowski & Ciereszko, 2001). В процессе эмбриогенеза происходит снижение уровня антиоксидантов, что особенно выражено у вылупившейся личинки, но затем, когда она переходит на экзогенное питание, содержание этих компонентов начинает постепенно нарастать, что было показано нами и другими авторами (Rudneva, 1999; Mourente et al., 2000).

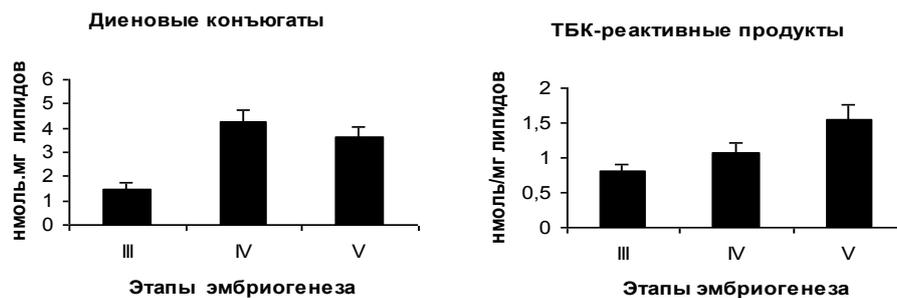


Рис. 2. Динамика параметров ПОЛ развивающихся эмбрионов черноморской камбалы-калкан *P. maxima maeotica*.

Индукция антиоксидантных ферментов во многом зависит от наличия их кофакторов – металлов, входящих в активный центр фермента. В развивающемся организме в случае дефицита необходимых металлов может возникнуть ферментативная недостаточность. К таким кофакторам относятся медь, цинк, железо, марганец и селен, являющиеся эссенциальными элементами. Их концентрация снижается у развивающихся эмбрионов, но затем восстанавливается при переходе на экзогенное питание (Ahmad, 2005). Клетки развивающегося зародыша постоянно нуждаются в антиокислительных ферментах, регулирующих содержание активных форм кислорода и предохраняющих организм от токсического действия продуктов ПОЛ. Антиоксидантные ферменты относятся к группе «house-keeping», то есть их м-РНК находится в неоплодотворенном яйце и при дальнейшем развитии начинается их активный синтез для обеспечения защиты зародыша от повреждающего действия свободных радикалов. Помимо этого, выявлена определяющая роль антиоксидантных ферментов (овопероксидазы) в процессах затвердевания оболочки икры после оплодотворения, механизм действия которой заключается в конвертировании свободных SH-групп на поверхности оболочки в –S-S- связи и, таким образом, уплотнении ее.

В дальнейшем происходит постепенное нарастание активности антиоксидантных ферментов при одновременном истощении запасов низкомолекулярных антиоксидантов. Наши исследования, проведенные на развивающейся демерсальной и пелагической икре некоторых черноморских рыб, а также данные, полученные другими исследователями, подтвердили эту закономерность (Рис. 3). В процессе раннего развития активность ферментов значительно возрастает и максимум ее приходится либо на период активного органогенеза (стадия III), либо к моменту вылупления личинки (стадия VI).

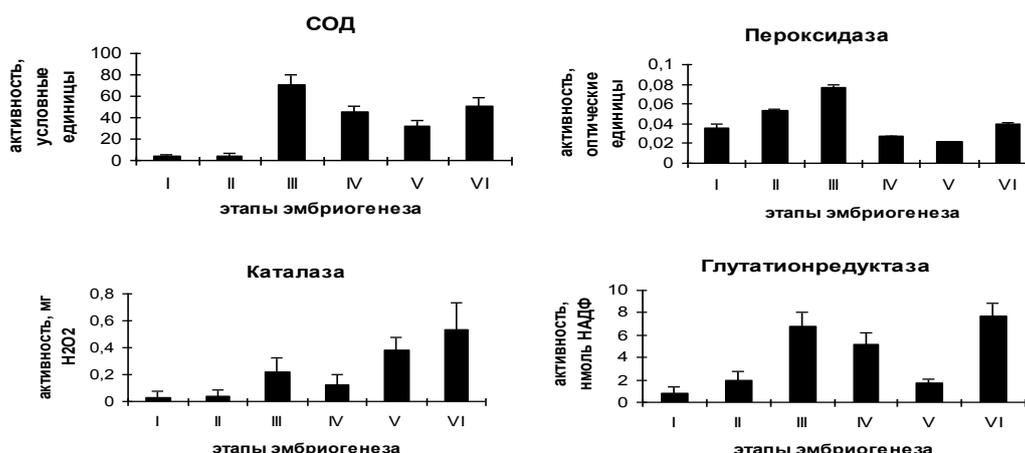


Рис. 3. Динамика активности антиоксидантных ферментов (мг белка⁻¹ мин⁻¹) развивающихся эмбрионов черноморской камбалы-калкан *P. maxima maeotica*

Таким образом, метаболические изменения, происходящие в развивающемся эмбрионе рыб, в конечном итоге определяют интенсивность процессов ПОЛ и АОО. На ранних этапах онтогенеза система антиоксидантных ферментов не совершенна и только по мере развития

эмбриона и особенно в период вылупления при переходе к непосредственному контакту с внешней средой активность этих ферментов возрастает. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов варьирует в широких пределах в икре морских животных, и их концентрация зависит, прежде всего, от состава пищи и ее доступности для родительских особей. Максимальная активность большинства антиоксидантных ферментов зафиксирована в период интенсивного органогенеза и к концу эмбриогенеза. В первом случае это совпадает с усилением процессов ПОЛ в связи с интенсивным метаболизмом и расходом энергетических субстратов, во втором – с выходом личинки из оболочки и подготовкой к экзогенному окислительному стрессу. Динамика содержания низкомолекулярных антиоксидантов характеризуется последовательным снижением в процессе эмбриогенеза и достигает минимальных величин к вылуплению и у личинок до перехода их на экзогенное питание, после чего вновь повышается в результате поступления их с пищей.

Изменение прооксидантно-антиоксидантного статуса рыб в эмбриогенезе отражает эволюционно сформировавшиеся механизмы адаптации зародышей к окислительному стрессу, вызванному сменой энергетических субстратов, нарастанием потребления кислорода, подготовкой к моменту вылупления и экзогенному стрессу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты: вчера, сегодня, завтра. В кн.: Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М.: Химия. 2005. Т. 2. С. 10-45.
2. Ahmad R.G. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? *Medical J. of Islamic World Academy of Sciences*. 2005. 1(2), 55-63.
3. Dabrowski k. & Ciereszko (2001). Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Res.* 32 (8). 623- 638.
4. Kadamura K., Nakashima T., Kurachi M., Yamaguci K., Oda T. (2006). Production of reactive oxygen species (ROS) by devil stinger (*Inimicus japonicus*) during embryogenesis. *Fish and Shellfish Immunology*. 21 (2). 209-214.
5. Mommsen T. P. & Walsh P. J. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. In *Fish Physiology: The Physiology of Developing Fish. Part A. Eggs and Larvae*, Vol. XI (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 347–406. San Diego: Academic Press.
6. Mourente G., Diaz-Salvago E., Tocher D.R., Bell J.G. (2000). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA/tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L, Osteichthys, Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23. 337-351.
7. Peters L.D., Livingstone D.R. (1996). Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *J. Fish Biol.* 49. 986-997.
8. Rudneva I.I. (1999). Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 122, 265-271.
9. Sole M., Portrykus J., Fernandez-Diaz C., Blasco J. 2004. Variations on stress defenses and metallothionein levels in the Senegal sole, *Solea senegalensis*, during early larval stages// *Fish Physiol. Biochem.* 30, 57-66.

MECHANISMS OF ADAPTATION TO OXIDATIVE STRESS IN FISH EARLY LIFE

I.I.Rudneva, V.G. Shaida

Institute of the Biology of the Southern Seas National Ukrainian Academy of Sciences, Sevastopol, Ukraine, e-mail: svg@mail.ru

During fish embryogenesis the alterations of energetic substrates and oxygen consumption cause the changes of the total metabolism, free radicals generation and antioxidant status of the developing embryos. Maximum value of lipid peroxidation was indicated at the period of organogenesis which was measured by microcalorimetric method and lipid peroxidation products determinations. At the early stages of development low molecular weight scavengers play an important role in the protection of the embryo against oxidative stress while at the end of embryogenesis and especially in new hatching larvae antioxidant enzymes activity increases progressively. In unfed larvae antioxidants content decreases and than enhances in larvae feeding zooplankton containing carotenoids, vitamins and amino acids.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ СУБАРКТИЧЕСКИХ ОЗЁР ЯМАЛА И ГЫДАНА

А.Г. Селюков, Л.А. Шуман

Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

E-mail: leonidshuman@yandex.ru

Конечным звеном трофической цепи арктических водоемов являются лососевидные рыбы, среди которых доминируют представители лососевых (*Salvelinus*) и сиговых (*Coregonus*). Именно эти виды определяют характерный облик Циркумполярной подобласти и всей Голарктики (Берг, 1949; Решетников, 1980). Они характеризуются продолжительным жизненным циклом, в течение которого могут аккумулировать различные токсиканты, в связи с чем необходима оценка морфофункционального состояния значимых видов рыб. Поддержание численности вида обеспечивается функционированием генеративной системы, поэтому половое созревание, плодовитость и особенности половых циклов являются важными индикаторами репродуктивной потенции вида, по которому оцениваются перспективы его существования.

Целью нашей работы было изучение морфофункционального состояния и репродуктивных характеристик лососевидных рыб озёр Ямала и Гыдана.

Озера тундровой зоны характеризуются низкой минерализацией вод, малым содержанием растворенного органического вещества и других биогенных элементов - например, азота общего, углерода общего. Основной источник питания тундровых озер – атмосферные осадки и пресная вода, образующаяся при сезонном оттаивании многолетнемерзлых пород.

Сбор ихтиологического материала проводили в августе 2011 г. в озерах Гыданского п-ова и Ямала. Исследовали арктического гольца, чира, сига-пыжьяна и пелядь в оз. Гольцовое (Гыдан), чира, сига-пыжьяна и сибирскую ряпушку – в оз. Лангтибейто (Ямал). Оценивали внешний вид, и аномалии в строении внутренних органов рыб. Для гистологического анализа в смеси Буэна фиксировали гонады, печень, почки, жабры, кишечник. Кровь взятую из гемального канала хвостового стебля использовали для приготовления мазков, часть свежих образцов крови использовали для определения концентрации гемоглобина. Гистологический анализ органов проводили по стандартным гистологическим методикам (Микодина и др., 2009). Нами была разработана новая методика определения пространственной локализации и соотношения половых клеток и стромы в яичниках с применением конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM-510META («Zeiss») и пакета программ для построения трёхмерных изображений участков яичников.

В ходе работ нами не было выявлено существенных морфологических нарушений в органах исследованных рыб.

Оз. Гольцовое расположено на севере Гыданского полуострова, вблизи оз. Периптавето. Озеро имеет овальную форму, вытянутую с северо-запада на юго-восток. Площадь около 300 га. У северо-западного берега из озера вытекает протока, впадающая в пойменное озеро р. Есяха. Северо-западный, частью южный и восточный берега пологие, большая часть – отвесные, высотой до 10 м, размываемые. Грунты на мелководье песчаные, на глубине с небольшой примесью ила. У всех берегов хорошо выражена песчаная литораль, занимающая значительную площадь. Глубины в среднем составляют 3,5м, максимальная – 22м. Прибрежно-водная растительность вокруг озера отсутствует, за исключением протоки. Характерно наличие погруженной растительности на глубинах от 2 м до 3,5 м, что, скорее всего, связано с сильным волнением и перемешиванием грунтов в литорали.

Арктический голец (*Salvelinus alpinus*). Гонады большинства особей обоего пола находились на II и III стадии зрелости. Старшей генерацией в яичниках являлись вителлогенные ооциты (рис. 1), среди которых присутствовали опустевшие фолликулы от прошлого нерестового сезона; в значительном количестве присутствовали половые клетки очередных генераций, представленные превителлогенными ооцитами разных размерных групп, которые обеспечивают достаточный репродукционный потенциал данного вида. При этом отклонений в яичниках и семенниках разных стадий зрелости не отмечено.

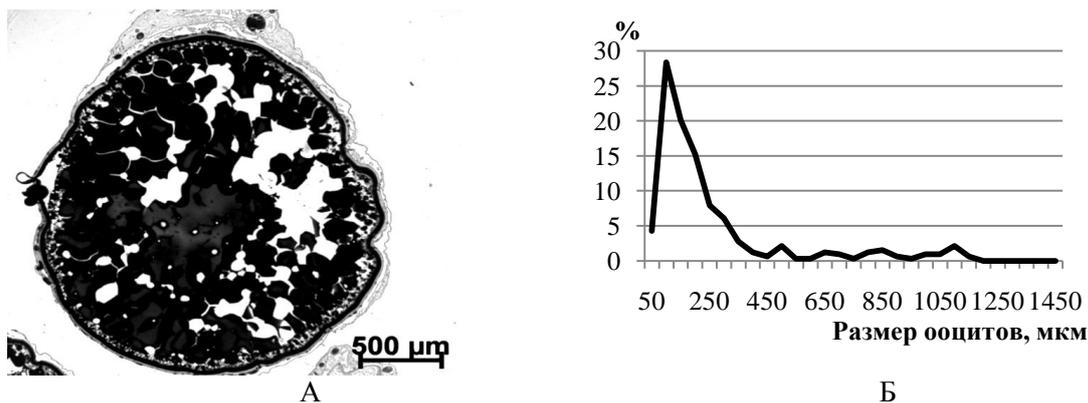


Рис. 1. Вителлогенный ооцит гольца (А) и размерный ряд ооцитов в яичниках гольца

В жаберном аппарате гольца были обнаружены незначительные отклонения: гиперплазия и лизис отдельных респираторных ламелл. В других органах гольца аномалий не обнаружено.

С и г - п ы ж ь я н (*Coregonus lavaretus pidschian*). Практически все отловленные особи были половозрелыми и готовились к предстоящему нересту. Старшей генерацией в яичниках являлись вителлогенные ооциты, однако доля ооцитов периода превителлогенеза многократно превышала остальные генерации и свидетельствовала о высоком репродукционном потенциале данного вида. У части самок отмечены резорбирующиеся ооциты фазы накопления желтка (рис. 2), тогда как ооциты фазы вакуолизации цитоплазмы становились старшей генерацией. Такие особи уже не смогут принять участие в предстоящем нересте и пропустят очередной нерестовый сезон. Значительных отклонений в других органах пыжьяна выявлено не было.

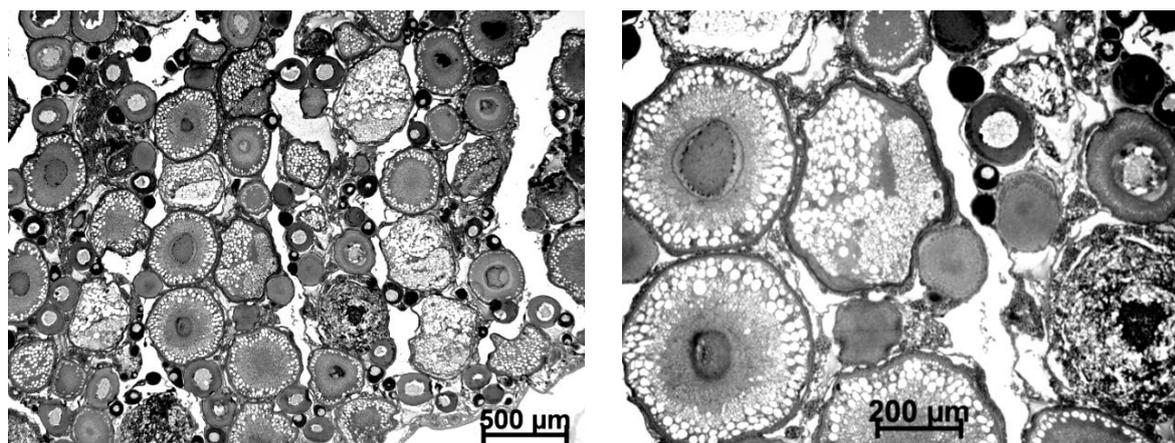
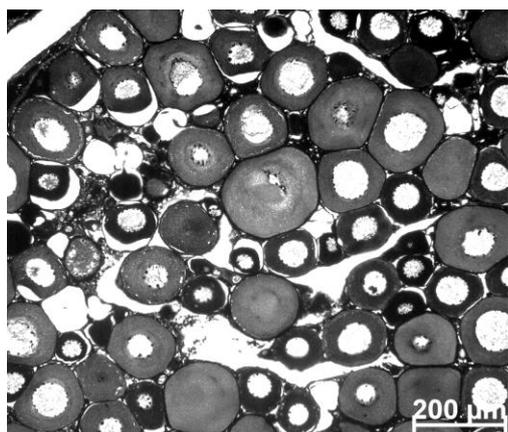


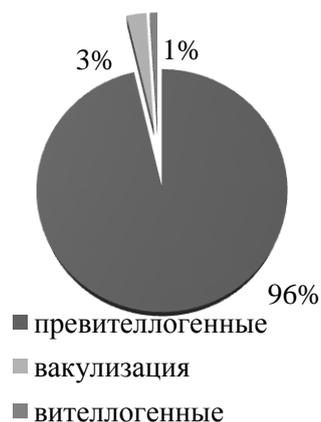
Рис. 2. Резорбция вителлогенных ооцитов в яичнике сига-пыжьяна

Ч и р (*Coregonus nasus*). В наших уловах чир был представлен 4+-8-летними особями, их гонады были слабо развиты: яичники находились на II и в начале III стадии зрелости, старшей генерацией половых клеток были соответственно превителлогенные ооциты и ооциты фазы вакуолизации цитоплазмы (рис. 3). Нарушения репродуктивной системы отсутствовали, хотя и отмечен значительный паразитарный пресс. У чира в исследуемом озере отмечено позднее половое созревание и низкая упитанность. Гонады самцов находились на II стадии зрелости. В жабрах чира были обнаружены немногочисленные аномалии в виде срастания респираторных ламелл.

Оз. Лангтибейто расположено на севере полуострова Ямал. Озеро имеет округлую форму и площадь около 700 га. У всех берегов выражена песчаная литораль. Глубины в среднем составляют около 3 м. Максимальная глубина – 6 м. Грунты на мелководье песчаные, очень плотные, на глубине с небольшой примесью ила. Вдоль западного берега на север от протоки у берега большое количество нанесенного растительного детрита. Вода очень мутная из-за большого количества взвеси.



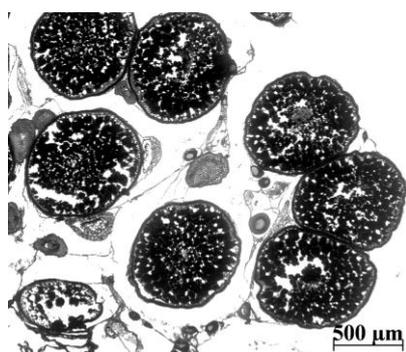
А



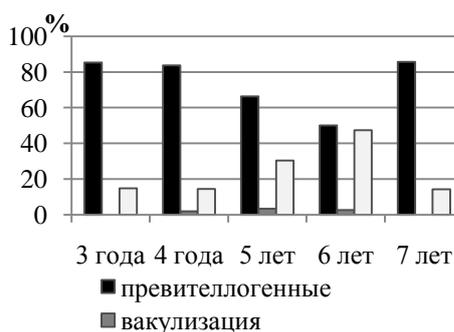
Б

Рис. 3. Яичники чира (А), и соотношение ооцитов разных генераций в них (Б)

Сибирская ряпушка (*Coregonus sardinella*). Возраст большинства рыб в среднем составляя 4-5 лет. Практически все изученные рыбы должны были отнереститься в предстоящем нерестовом сезоне. Их гонады находились при завершении III стадии зрелости (рис. 4). У самок старшая генерация половых клеток завершала вителлогенез, а между ними локализовались гнезда превителлогенных ооцитов – половые клетки очередной генерации. Помимо типичной формы, созревающей в 3-5 лет, в оз. Лангтибейто нами выявлена мелкая форма, достигающая половой зрелости уже в 1+. У таких особей яичники находились на III стадии зрелости, ооциты старшей генерации в которых завершали вителлогенез, а между ними распределялись ооциты фазы вакуолизации цитоплазмы.



А



Б

Рис. 4. Яичники ряпушки (А) и соотношение половых клеток разных генераций в них (Б)

Таким образом, сибирская ряпушка в оз. Лангтибейто представлена типичной и быстросозревающей формами. Все исследованные особи были в 3-7-летнем возрасте половозрелыми и только у отдельных экземпляров отмечены аномалии репродуктивной системы, не выходящие за пределы нормы.

С и г - п ы ж ь я н . Часть самок были неполовозрелыми, яичники остальных находились на III стадии зрелости, в которых старшей генерацией являлись вителлогенные ооциты и составляющие очередную генерацию ооциты периода превителлогенеза. Гонады большинства самцов также были на III стадии зрелости – в семенных канальцах накапливались сперматиды и спермии.

Нами было проведено сравнение гематологических показателей у сига-пыжьяна из исследованных озёр (рис. 5). У сига-пыжьяна из оз. Лангтибейто количество лимфоцитов в периферической крови меньше чем у особей из оз. Гольцовое, но в то же время уровень паразитарной инвазии выше, это объясняется тем, что лимфоциты скорее всего локализируются в тканях организма, обеспечивая противопаразитарный иммунитет. Так же у особей из оз. Лангтибейто в среднем более высокий уровень бластоцитов, что связано с ответной реакцией на паразитарную инвазию.

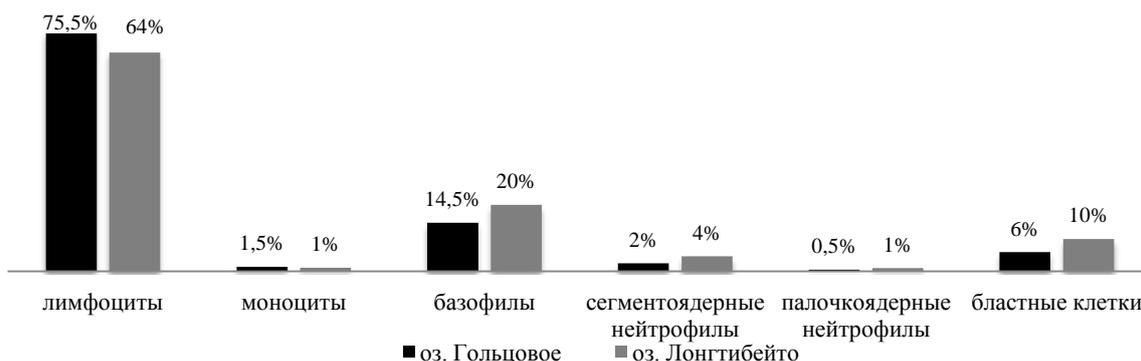


Рис. 5. Лейкоцитарная формула у сига-пыжьяна из озёр Гольцовое и Лонгтибейто.

Таким образом, у гольца и сиговых рыб в исследованных озерах севера Гыдана и Ямала значительных нарушений в состоянии различных органов не выявлено. Спецификой половых циклов является пропуск большей частью половозрелых особей очередного нереста, обусловленный кратким нагульным периодом и слаборазвитой кормовой базой, снижающими возможность репарации репродуктивной системы в посленерестовый период и пополнение фонда половых клеток, предназначенных для нереста. Обусловленный суровыми климатическими условиями столь же длительный характер репарационных процессов в посленерестовый период ранее установлен у муксуна и пеляди в Обь-Иртышском бассейне (Селюков, 1986; Селюков, 2002; Селюков, 2007). Кроме того, у исследованных рыб в большей (пелядь, чир, сибирская ряпушка) или меньшей (голец, сиг-пыжьян) степени на внутренних органах и в кишечнике, реже – в гонадах присутствуют паразиты на разных стадиях развития. Паразитарный фактор ухудшает общее состояние организма, снижает жирность, размерно-весовые и репродукционные показатели, сокращает продолжительность репродуктивной активности и жизненного цикла. Вместе с тем, основа репродукционного потенциала – устойчивое пополнение резервного фонда половых клеток – и в этих условиях остается стабильной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берг Л.С. Рыбы пресных вод СССР и сопредельных стран. М.-Л.: АН СССР. 1949. Т. III. С. 1195-1315.
2. Решетников Ю.С. Экология и систематика сиговых рыб. М.: Наука, 1980. 301 с.
3. Микодина Е. В., Седова М. А., Чмилевский Д. А. и др. Гистология для ихтиологов: Опыт и советы. М.: ВНИРО. 2009. 112 с.
4. Селюков А. Г. Оогенез и половые циклы самок пеляди *Coregonus peled* (Gmelin) озера Ендырь (бассейн Оби) // Вопр. ихтиологии. 1986. Т. 26. Вып. 2. С. 294-302.
5. Селюков А. Г. Репродуктивная система сиговых рыб (Coregonidae, Salmoniformes) как индикатор состояния экосистемы Оби. I. Половые циклы пеляди *Coregonus peled* // Вопр. ихтиологии. 2002а. Т. 42. №1. С. 85-92.
6. Селюков А. Г. Репродуктивная система сиговых рыб (Coregonidae, Salmoniformes) как индикатор состояния экосистемы Оби. II. Половые циклы муксуна *Coregonus muksun* // Вопр. ихтиологии. 2002б. Т. 42. №2. С. 225-235.
7. Селюков А. Г. Морфофункциональный статус рыб Обь-Иртышского бассейна в современных условиях. Монография. Тюмень: ТюмГУ. 2007. 184 с.

MORPHOFUNCTIONAL STATE OF THE SALMONID FISHES IN THE SUBARCTIC LAKES OF YAMAL AND GYDAN

A.Selukov, L. Shuman

Tyumen state university, Tyumen, Russia e-mail: leonidshuman@yandex.ru

In this paper studied the morphology and function of whitefish and salmon fishes in tundra lakes of Yamal peninsulas and Gydan. The authors made histological analysis of gonads, liver, kidney, gills and analysis of hematological parameters of *Salvelinus alpinus*, *Coregonus lavaretus pidschian*, *Coregonus nasus*, *Coregonus sardinella*.

РОЛЬ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В АДАПТАЦИИ КАРПА К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ ЦИНКА

Ю.И. Сенник, В.Я. Бияк, В.А. Хоменчук, Грубинко В.В., Курант В.З.

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, г.

Тернополь, Украина

senykjura@rambler.ru

Металлы, входящие в состав организмов играют важную роль в их жизнедеятельности и поэтому являются регуляторами многих физиологических и биохимических процессов. Вместе с тем, некоторые из них, попадая в гидросистемы из естественных и антропогенных источников являются крайне токсичными для гидробионтов. При этом как биогенные, так и небиогенные металлы обладают выраженной токсичностью в дозах, превышающих оптимальные.

Поэтому нормальное функционирование организмов гидробионтов определяется наличием оптимального количества металлов и формой их нахождения в водной среде.

Известно, что организм обладает способностью адаптироваться к действию ионов металлов и регулировать количество их поступления. Одним из важных механизмов лимитирования поступления металлов является структурная перестройка биологических мембран. Поэтому нами было исследовано липидный состав мембран эритроцитов карпа при действии ионов цинка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на двухлетках карпа (*Cyprinus carpio L.*), массой 250 - 300 г., содержащихся в аквариумах объемом 200 л с отстоянной водопроводной водой, при следующих условиях: содержание O_2 - $7,5 \pm 0,5$ мг / л CO_2 - $2,5 \pm 0,3$ мг / л pH - $7,8 \pm 0,1$. В каждом аквариуме содержалось по 5 рыб. Рыб во время акклимации не кормили.

Исследовали влияние 0,5 и 2 рыбохозяйственных предельнодопустимых концентраций (ПДК) ионов цинка, что составляет 0,005 мг/л и 0,02 мг/л Zn^{2+} соответственно. Необходимую концентрацию ионов цинка в воде создавали растворением соли $ZnCl_2$ квалификации "х.ч." (Беспамятнов, 1985).

Период акклимации рыб составлял 14 дней, что является достаточным для формирования адаптивного ответа на действие стресс-фактора.

Для биохимического исследования содержания липидов и их отдельных классов были использованы мембраны эритроцитов. «Тени» эритроцитов получали путем осмотического гемолиза в 0,01 М растворе хлорида натрия. Соотношение суспензии эритроцитов и гипотонического раствора - 1:50. Затем их ресуспендировали в этом же растворе и трижды отмывали в растворе Рингера для хладнокровных с последующим центрифугированием и отделением супернатанта в течении 10 мин при 3000 об / мин. (Whittam, 1964). Для извлечения общих липидов использовали хлороформ-метаноловую смесь в отношении 1:2 по методу Фолча. При этом, к одной объемной доли эритроцитарной массы добавляли 20 частей экстрагирующей смеси. Нелипидные примеси из экстракта удаляли путем отмывания их 1% раствором KCl. Количество общих липидов в мембранах эритроцитов определяли весовым методом после отгонки экстрагирующей смеси (Кейтс, 1975).

Разделение липидов на отдельные фракции производили методом восходящей одномерной тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol UV-154". Полученный хлороформный раствор липидов сначала упаривали досуха, а потом растворяли в 1 мл хлороформа. Полученные пробы липидов наносили на пластинку микродозатором в количестве 25 мкл, и медленно помещали их в хроматографические камеры. Подвижной фазой для разделения фракций фосфолипидов была смесь хлороформ-метанол-ледяная уксусная кислота-вода в соотношении 60:30:7:3. Полученные хроматограммы проявляли в камере, насыщенной парами йода, для идентификации отдельных фракций липидов использовали специфические реагенты и очищенные стандарты (Кейтс, 1975).

Количество фосфолипидов определяли по методу Васьковского (Vaskovsky, 1985). Минерализацию фосфолипидов проводили при температуре $180^{\circ}C$ после добавления концентрированной хлорной кислоты. Оптическую плотность фосфора определяли спектрофотометрически (Стефаник, 1985).

Все полученные данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных общего содержания липидов в мембранах эритроцитов карпа показал, что за действия допороговой концентрации ионов цинка их количество практически не изменялось, тогда как сублетальная концентрация вызвала достоверное снижение этого показателя в 1,35 раза.

С целью изучения физиологического значения отдельных представителей фосфолипидов в процессе акклимации рыб к действию повышенных концентраций цинка, проведено исследование их количественного содержания в мембранах эритроцитов опытных рыб (рис.1).

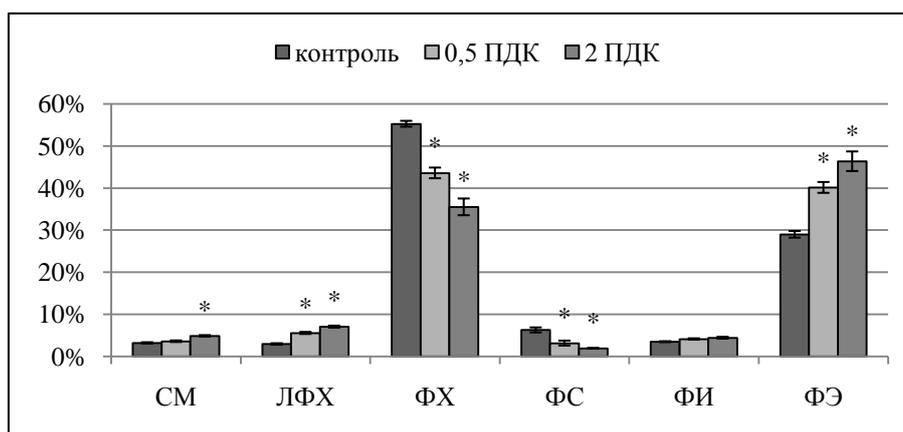


Рис. 1. Соотношение фракций фосфолипидов в эритроцитах карпа вследствие воздействия ионов цинка ($M \pm m$, $n = 5$)

* - отклонение исследуемых показателей у рыб исследовательских групп относительно контроля достоверны ($p < 0,05$); СМ – сфингомиелин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ФХ – фосфатидилхолин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФЭ - фосфатидилэтанолламин

За действия допороговых и сублетальных концентраций ионов цинка, нами выявлены значительные изменения в относительном содержании фосфатидилхолина, количество которого наиболее в билипидном слое эритроцитов (Vega, 1986). Так, было установлено достоверное снижение содержания данной фракции, соответственно, в 1,22 и 1,47 раза. Снижение содержания фосфатидилхолина в фосфолипидной фракции мембран эритроцитов может быть связано с его деградацией, вследствие повышения активности лизосомальной фосфолипазы A_2 , которая присутствует в плазме животных (Abe, 2010). Данный процесс сопровождается накоплением лизофосфатидилхолина, количество которого возрастает, соответственно, в 1,26 и 1,66 раза ($p < 0,05$), и свободных жирных кислот (Mukherjee, 1994). Увеличение количества анионных фосфолипидов и неэстерифицированных жирных кислот, а также параллельное снижение количества фосфатидилхолина способствует дальнейшей активации фосфолипазы A_2 (Olivera, 1993).

Известно, что фосфатидилэтанолламин является предшественником в синтезе фосфатидилхолина в реакции метилирования. Вероятно, повышенные концентрации цинка ингибируют активность метилтрансферазы, уменьшая, тем самым, производительность реакции синтеза фосфатидилхолина. Подтверждением данного предположения является факт накопления фосфатидилэтанолламина в мембранах эритроцитов рыб после 14-дневной интоксикации ионами металла. Так, за действия токсиканта в концентрации, что соответствует 0,5 и 2 ПДК, содержание ФЭ увеличилось, соответственно, в 1,38 и 1,56 раза ($p < 0,05$).

Возрастание процентного соотношения СМ при действии допороговой и сублетальной концентраций токсиканта, соответственно, в 1,12 и 1,36 раза, хотя при этом количественное содержание данной фракции практически не отличается от результатов контрольной группы, указывает на перераспределение фракций липидов наружного слоя биомембраны эритроцитов.

Сходный характер изменений количественного содержания наблюдается и для фосфатидилинозитола. Так, при воздействии 0,5 ПДК ионов цинка отмечается увеличение процентного соотношения данной фракции в билипидном слое мембран эритроцитов в 1,19

раза, тогда как количественные изменения данной фракции находятся в пределах нормы. Видимо, такие показатели можно объяснить изменением количественного содержания общих липидов в биомембране эритроцитов исследуемых рыб. За действия 2 ПДК ионов металла содержание данной фракции выросло в 1,27 раза, тогда как количество фосфатидилинозитола снизилась в 1,22 раза. Полученные результаты, очевидно, могут быть следствием активации фосфолипазы A_2 , ведь известно, что ФИ является неспецифическим субстратом этого фермента (Mahadevarra, 1982). Снижение содержания ФИ в мембране эритроцитов акклимированных к действию 2 ПДК токсиканта рыб может выступать компенсаторной реакцией на рост количества токсиканта в среде, ведь известно, что ионы Zn^{2+} взаимодействуют с Ca^{2+} -рецепторами фосфатидилинозитидной сигнальной системы, вследствие чего открываются Ca^{2+} -каналы и ионы токсиканта поступают внутрь клетки.

Для подтверждения приведенных выше рассуждений и оценки значения изменений фосфолипидного спектра были рассчитаны коэффициенты отношения различных фракций фосфолипидов (рис. 2).

Изменения соотношения между липидами, локализованные на внешней стороне мембраны к фосфолипидам внутренней мембранной поверхности вызваны действием как допороговой, так и сублетальной концентрацией ионов цинка. Коэффициент $ФХ / (ФЭ + ФИ + ФС)$ достоверно уменьшается, соответственно, в 1,55 раза за действия 0,5 ПДК токсиканта, а вследствие влияния 2 ПДК - в 2,12 раза по сравнению с контролем. Подобная асимметрия размещения фосфолипидов способствует увеличению микровязкости мембран.

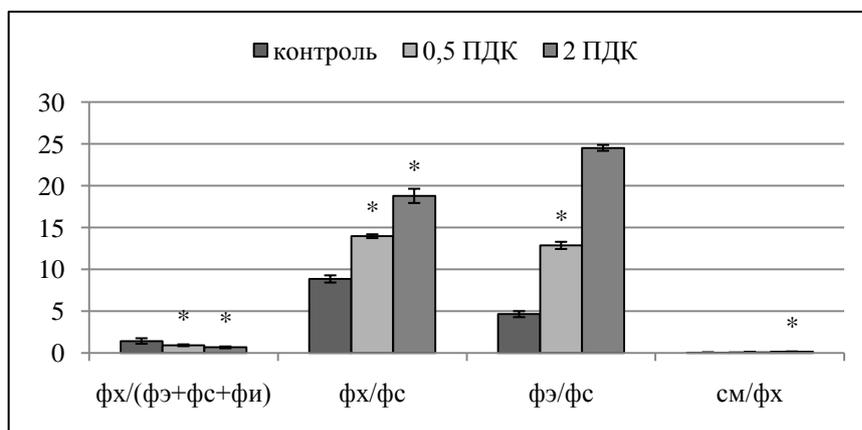


Рис. 2 Влияние ионов цинка на соотношение различных фракций фосфолипидов в эритроцитах акклимированных рыб ($M \pm m$, $n = 5$).

Заслуживает внимания тот факт, что за счет действия повышенных концентраций ионов цинка наблюдается значительный рост соотношения $ФЭ/ФС$ в 2,77 раза ($p < 0.05$) и в 5,25 раза, соответственно, за действия 0,5 и 2 ПДК. Данное соотношение показывает интенсивность синтеза $ФЭ$ из его предшественника - $ФС$. Полученные результаты являются косвенным показателем увеличения вязкости мембраны в исследованных рыб (Wodtke, 1978). Увеличение показателя $ФХ/ФС$, очевидно, является следствием интенсификации пути превращения фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин. Рост соотношения $СМ/ФХ$ не является результатом превращения фосфатилхолина в сфингомиелин, ведь установлено, что количественное содержание $СМ$ в мембранах эритроцитов обеих исследованных групп рыб не изменяется по сравнению с контролем, а является следствием деградации $ФХ$. Тем не менее, полученные результаты указывают на перераспределение фракций фосфолипидов на внешней стороне биомембраны. Такие изменения холин-содержащих липидов способствует росту вязкости билипидного слоя эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Беспмятников Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. Л.: Химия, 1985. 304 с.
2. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 322 с.

3. Стефаник М.Б., Скорохид В.И., Елисеева О.П. Тонкослойная и газожидкостная хроматография липидов. Львов, 1985. 27 с.
4. Abe A., Kelly R., Shaymana J. A. The measurement of lysosomal phospholipase A₂ activity in plasma / Journal of Lipid Research, 2010. Vol. 51. P. 2464-2470.
5. Filho changes in the lipid composition of erythrocytes during prolonged fasting in lizard (*TropidurusTorquatos*) and rat (*RattusNorvegicus*) / Vera L. M. Lima, Michael P. T. Gillett, Marcia N. Silva et al. // Comp. Biochem. Physiol, 1986. Vol. 83B, № 3. P. 691-695.
6. Mahadevappa V.G., Holub B.J. The molecular species composition of individual diacyl phospholipids in human platelets / Biochim Biophys Acta. 1982. Vol. 713. P. 73-79.
7. Mukherjee A.B., Miele L., Pattabiraman N. Phospholipase A₂ enzymes. Regulation and physiological role / Bioch.pharmacology. 1994. Vol. 48, № 1. P. 1-10.
8. Olivera A., Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation in ducedby PDGF and FCS mitogens.Nature, 1993 Vol. 365. P. 557-560.
9. Whittam R., Ager M. Aspects of adenosine-triphosphatase activity in erythrocyte membranes // Biochem. J. 1964., Vol.93. P. 337-348.
10. Wodtke E. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures phospholipid composition, fatty acid pattern, and cholesterol content / Biochimica et Biophysics Acta., 1978. Vol. 529. P. 280-291.

ROLE OF ERYTHROCYTE MEMBRANE LIPIDS IN THE ADAPTATION CARP TO ACTION ZINC IONS

J.I. Senyk, V.Ya. Byyak, V.A. Khomenchuk, V.V. Grubinko, V.Z. Kurant

The changes in lipid composition of erythrocyte membranes of carp exposed to elevated concentrations of zinc ions. Displaying a variety of adaptive mechanisms associated with quantitative changes and redistribution of phospholipids in erythrocyte fractions of carp.

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ НА АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КАРПА

Ю.И. Сенник, Б.З. Ляврин, В.А. Хоменчук, Курант В.З.

Тернопольский национальный педагогический университет им. Владимира Гнатюка, г.

Тернополь, Украина

senykjura@rambler.ru

Активный транспорт веществ у гидробионтов осуществляет поступление биологически важных веществ и ионную регуляцию их организма. Из литературных источников известно (Verboost et al., 1989), что катионы двухвалентных металлов в чрезмерных количествах способны ингибировать работу АТФ-азных систем водных организмов. Поэтому нами было изучено изменение активности АТФ-аз в эритроцитах карпа при действии повышенных концентраций ионов цинка и кадмия. АТФ-азная активность при этом, в основном, обусловлена функционированием специфических Na⁺, K⁺ и Ca²⁺-АТФ-аз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на двухлетках карпа (*Cyprinus caprio L.*), массой 250 - 300 г, содержащихся в аквариумах объемом 200 л с отстоянной водопроводной водой, при следующих условиях: содержание O₂ - 7,5 ± 0, 5 мг / л CO₂ - 2,5 ± 0,3 мг / л pH - 7,8 ± 0,1. В каждом аквариуме содержалось по 5 рыб.

Исследовали влияние 0,5 и 2 рыбохозяйственных предельнодопустимых концентраций (ПДК) ионов цинка и кадмия. Необходимые концентрации ионов металлов в воде создавали растворением соли ZnCl₂ и CdCl₂·2,5H₂O квалификации "х.ч." (Беспамятнов, 1985).

Для биохимического исследования содержания липидов и их отдельных классов были использованы мембраны эритроцитов. «Тени» эритроцитов получали путем осмотического гемолиза в 0,01 М растворе хлорида натрия (Whittam, 1964).

Исследование АТФ-азной активности в мембранных препаратах эритроцитов карпа проводили по методике (Dang, 2000). Среда инкубации для определения общей АТФ-азной активности содержала (ммоль/л): NaCl - 100,0; KCl - 20,0; MgCl₂ - 3,0 CaCl₂ - 0,01; АТР-Na₂ - 5;

трис-НСl - 40,0 (рН 7,2). Активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы определяли без NaCl с добавлением в среду инкубации 1 мМ оуабаина (ингибитор Na^+ , K^+ -АТФ-азы плазматической мембраны).

Активность исследуемых АТФ-аз оценивали по количеству образовавшегося фосфат-аниона и выражали в $\mu\text{моль } \text{P}_i \cdot \text{час}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка. Количество продукта реакции P_i определяли модифицированным методом Фиске-Суббароу (Прохорова, 1982). Содержание белка - по методу Лоури.

Все полученные данные обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При воздействии повышенных концентраций ионов кадмия наблюдается общая тенденция к снижению активности обеих исследуемых АТФ-аз (рис. 1). После 0,5 ПДК ионов металла установлено снижение активности Na^+/K^+ - и Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-аз, соответственно, в 1,22 и 1,45 раза ($p < 0,05$). При воздействии сублетальной концентрации токсиканта данные показатели снизились в 1,48 и 2,16 раза ($p < 0,05$). Снижение активности Na^+/K^+ -насоса мембран эритроцитов, возможно, связано с неспецифическим взаимодействием ионов кадмия с SH-группами данного фермента (Satyavathi, 2001).

Значительные изменения активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы при воздействии повышенных концентраций токсиканта, вероятно, обусловлено непосредственным связыванием ионов Cd^{2+} с Ca^{2+} -сайтом фермента. Sarkadi и соав. (Sarkadi et al., 1988) показали, что Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы различных тканей является иммунологически различными, но обладают консервативным Ca^{2+} , Mg^{2+} -связывающим сайтом, что, очевидно, делает их одинаково чувствительными к действию ионов кадмия.

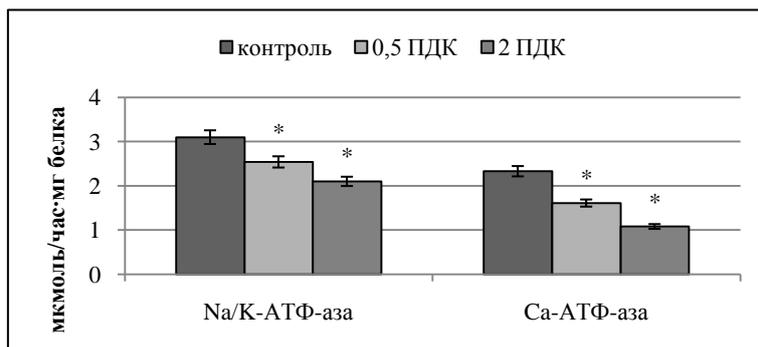


Рис. 1. Na^+/K^+ - та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азная активность мембран эритроцитов карпа акклиматизированного к действию 0,5 и 2 ПДК ионов кадмия ($M \pm m$, $n=5$).

Иной характер изменений АТФ-азной активности наблюдали в эритроцитах карпа, при действии повышенных концентраций ионов цинка (рис. 2).

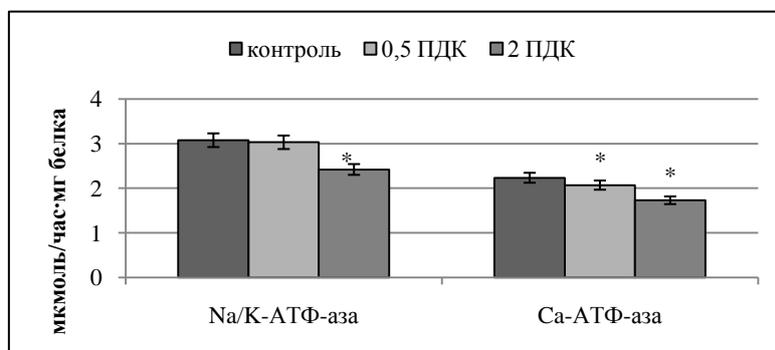


Рис. 2. Na^+/K^+ - та $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азная активность мембран эритроцитов карпа акклиматизированного к действию 0,5 и 2 ПДК ионов цинка ($M \pm m$, $n=5$).

Действие 0,5 ПДК ионов металла не влияло на функционирование активность Na^+/K^+ -АТФ-азы, тогда как активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азы снизилась в 1,10 раза. При действии 2 ПДК ионов металла установлено достоверное снижение активности обоих ионных насосов,

соответственно, в 1,27 и 1,29 раза. Изменения активности Na^+/K^+ -АТФ-азы эритроцитов, очевидно, обусловлено образованием устойчивых комплексов ионов Zn^{2+} с SH-группами, входящими в состав полипептида энзима (Pivovarova, 1996). Вследствие эквивалентных изменений активности исследуемых ферментов можно предположить аналогичный механизм действия ионов Zn^{2+} и на Ca^{2+} -АТФ-азу.

Полученные нами результаты показателей активности Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -АТФ-аз мембран эритроцитов карпа акклиматизированного к действию повышенных концентраций ионов Zn^{2+} и Cd^{2+} указывают на большую токсичность кадмия, по сравнению с цинком. Очевидно, данный факт можно объяснить большей афинностью ионов Cd^{2+} к сульфгидрильным группам исследуемых ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Беспаятнов Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник. Л.: Химия, 1985. 304 с.
2. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под. ред. М.И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
3. Amino acid sequence of a Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence / McLennon D.H., Brandl C.J., Korczak B., Green, N.M. // Nature, 1985. Vol. 316. P. 696-700.
4. Cadmium Inhibition of the Erythrocyte Ca^{2+} Pump / Verboost P. M., Flik G., Pang P.K.T. et al.// The journal of biological chemistry, 1989. Vol. 264, №. 10. P. 5613-5615.
5. Characterization of membrane calcium pumps by simultaneous immunoblotting and ^{32}P radiography / Sarkadi, B., Enyedi, A., Penniston, J.T. et al. // Biochim. Biophys. Acta, 1988. Vol. 939. P.40-46.
6. Dang Z., Lock R.A.C., Flik G. Na^+/K^+ -ATPase Immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper // J. Exp. Biol. 2000. Vol. 203. P. 379-387.
7. Pivovarova N. Lagerspetz K. Effect of cadmium on the ATPase activity in gills of *Anodonta cygnea* at different assay temperatures. // J Therm Biol., 1996. Vol.21 P.77-84.
8. Satyavathi C., Rao Y.P. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATP-ase in *Penaeus Indicus Postlarvae* by lead // Comp. Biochem. Physiol., 2001. Vol. 127C, № 1. P. 11-22.
9. Verboost P.M., Senden M.H., van Os C.H. intracellular Ca^{2+} stores in intestinal epithelium // Biochim Biophys. Acta, 1987. Vol. 902. P. 247-252
10. Whittam R., Ager M. Aspects of adenosine-triphosphatase activity in erythrocyte membranes // Biochem. J. 1964., Vol.93. P. 337-348.

INFLUENCE OF HIGHER CONCENTRATIONS OF ZINC AND CADMIUM IONS ON ATP-ASE ACTIVITY OF CARP ERYTHROCYTES

J.I. Senyk, B.Z. Lyavrin, V.A. Khomenchuk, V.Z. Kurant

The influence of elevated concentrations of zinc and cadmium ions on the activity of Na^+/K^+ - and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-ase of carp erythrocytes and direct relationship between changes in enzyme activity and the nature and concentration of toxicants in the environment were studied. These changes are result the direct interaction of metal ions with the protein molecule of enzyme.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ КАК ПОКАЗАТЕЛИ УСТОЙЧИВОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРЭСНОВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ

Л.Е. Сигарева

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия

E-mail: sigareva@ibiw.yaroslavl.ru

Началом изучения растительных пигментов считается выделение из листьев растений зеленого вещества – хлорофилла в 1817 г. французскими химиками П.Ж. Пельтье и Ж.Б. Каванту, что произошло только через полвека после открытия фотосинтеза Д. Пристли. Признанием значимости изучения растительных пигментов была Нобелевская премия по химии (1915 г.), которой удостоен Р. Вильштеттер. В России изучение растительных пигментов связано с К.А. Тимирязевым, который объединил в триаду такие понятия, как «солнце, жизнь и

хлорофилл». В отечественной гидробиологии и экологии широкое применение пигментных характеристик началось после предложения Г.Г. Винберга использовать хлорофилл в качестве показателя биомассы, интенсивности фотосинтеза и первичной продукции водорослей. Перечень научных дисциплин и прикладных проблем, для решения которых применяются растительные пигменты, постоянно увеличивается. Многостороннее изучение растительных пигментов – уникальных биохимических маркеров – раскрывает их информационное значение для понимания жизни на разных уровнях организации – от молекулярного до биосферного. Защитные свойства растительных пигментов востребованы в медицине, а индикаторные – в космическом мониторинге и добыче полезных ископаемых. Растительные пигменты – незаменимые показатели структуры растительных сообществ и таксономической принадлежности водорослей в тех случаях, в которых невозможны исследования морфологии клеток с помощью микроскопов. Сведения о концентрации хлорофилла используются для математического моделирования первичной продукции органического вещества, а также для оценки и прогнозирования экологического состояния водоемов, для изучения эвтрофирования и загрязнения. Особый интерес для расшифровки природной летописи свойств экосистем представляют растительные пигменты в донных отложениях (Szymczak-Żyła, Kowalewska, 2009; Reuss et al., 2010). Основа многостороннего применения пигментных характеристик – наличие инструментальных возможностей измерения количественных и качественных свойств и функций пигментов.

Цель настоящего обобщения – обосновать возможности применения растительных пигментов для изучения устойчивости функционирования пресноводной экосистемы на базе закономерностей формирования и трансформации фонда растительных пигментов. В работе использованы материалы, полученные автором или под руководством (с 1972 по 2010 гг.) на водохранилищах Волги и близко к ним расположенных озерах Ярославской области (Плещеево и Неро). Представления о фонде растительных пигментов сформулированы на основе теории функционирования водных экосистем и ее связей с продукционной гидробиологией (Алимов, 2004), а также экологических работ по первичной продукции и растительным пигментам (Винберг, 1960; Бульон, 1994; Сигарева, 2006; Szymczak-Żyła, Kowalewska, 2009; Reuss et al., 2010; Sigareva, Timofeeva, 2011).

Один из показателей устойчивого функционирования изменений в окружающей среде – динамическое равновесие между процессами синтеза и разрушения органического вещества, т.е. между интенсивностями новообразованного при фотосинтезе и утилизируемого в деструкционных процессах вещества. Рассчитанный предел устойчивости для биосферы оценивается в 1% и характеризует допустимое антропогенное потребление продукции биосферы (Горшков, 1988). Устойчивость экосистемы состоит в том, что в течение длительного времени существования система сохраняет свои свойства во времени и пространстве. Стабильное состояние поддерживается за счет биологического разнообразия и цикличности биогеохимического круговорота. Учитывая первостепенную роль первичной продукции в структурно-функциональной организации экосистемы, в нашей работе показателем устойчивого существования экосистемы предложено считать сбалансированность фонда растительных пигментов, их синтеза и разрушения. Далее раскрывается экологический смысл **концепции о растительных пигментах как показателях устойчивого функционирования экосистемы**.

Растительные пигменты – системные показатели. Наличие и распространенность пигментов во всех типах экосистем и в разных условиях внешней среды – неотъемлемое свойство экосистем. Растительные пигменты в природных объектах представлены обычно хлорофиллами, каротиноидами, фикобилинами и различными дериватами. Закономерности пространственно-временного распределения пигментов обусловлены свойствами экосистемы, к которым относят целостность, упорядоченность (организованность), иерархичность. Если считать, что специфика водных экосистем, как и наземных, заключается в том, что их организация способствует пространственной экспансии организмов при наиболее полном использовании факторов среды, то роль растительных пигментов состоит в обеспечении работы фотосинтетического аппарата путем наиболее полного и рационального использования энергии проникающей в воду солнечной радиации.

Фонд растительных пигментов – сложная биогеоинформационная система, состоящая из метаболически активных растительных пигментов и продуктов их разрушения, объединенных между собой потоками вещества и энергии, продукционно-деструкционными процессами, а также связями с внутренними (в организме) и внешними (в водоеме) условиями среды. Особенности пигментного фонда как свойства системы – невозможность существования вне экосистемы. Также важна и обратная связь – невозможность функционирования экосистемы без пигментной системы. Схема экологической структуры фонда растительных пигментов водоема включает источники пигментов и их поток из водной толщи в донные отложения. Если пигментные системы верхнего (водного) и нижнего (донного) ярусов водоема считать отдельными элементами пигментной системы водоема, то объединенную систему в целом можно выделить как один из элементов пигментной системы более сложного объекта – биосферы.

Источниками растительных пигментов в водоеме могут быть автохтонное органическое вещество, образованное в самом водоеме, а также аллохтонное органическое вещество, поступившее в водоем извне (из другого водоема или с водосбора). Автохтонное органическое вещество – итог новообразования и утилизации первичной продукции – автотрофов и вторичной продукции – гетеротрофов. Автотрофы синтезируют пигменты в процессах первичного продуцирования, гетеротрофы участвуют в деструкционных превращениях органического вещества (и пигментов). Природное аллохтонное органическое вещество, поступающее в водоем с водосбора, обычно обеднено растительными пигментами.

Хлорофилл в донных отложениях – часть общего фонда растительных пигментов водоема. Источники пигментов в отложениях, как и в других биотопах, – автотрофы – высшие и низшие растения. Непосредственно в водоеме это: высшая водная растительность и водоросли различных экологических группировок – фитопланктона, обрастаний макрофитов и других природных и антропогенных субстратов неорганического происхождения, а также мезофитон и микрофитобентос. С аллохтонным органическим веществом в водоем могут поступать пигменты высшей наземной растительности и почвенных водорослей. Осадочные пигменты неравномерно распределены в донных отложениях, их концентрация зависит от соотношения интенсивностей продукционных и деструкционных процессов.

Механизм поступления хлорофилла и других растительных пигментов из водной толщи в донные отложения – седиментация взвеси, содержащей живые организмы и детрит, наряду с минеральной составляющей, пополняющейся при абразии берегов и эрозионных процессах. В мелководной зоне растительные пигменты могут быть индикаторами микрофитобентоса, а в глубоководной – растительного материала, недоиспользованного в планктонной трофической цепи. Осадки внутренних водоемов образуются в различных условиях, связанных с климатом, гидродинамикой и антропогенным воздействием. Преобразование осадков проходит разные этапы – от неравновесной, сильно обводненной и обогащенной органическим веществом системы до образования твердой фазы и перерождения осадков в осадочную породу. Скорость превращения вещества в осадках зависит от глубины захоронения, активный слой занимает верхние 5–10 см.

Экологические зоны водоема, выделяемые как участки с различными условиями для развития организмов, различаются по составу пигментов. Особенность пигментного фонда донных отложений – более сильная трансформация по сравнению с пигментным фондом в фотосинтезирующей зоне. В мелководной зоне, благоприятной для функционирования растительных сообществ, где обычно преобладают продукционные процессы, основу пигментов составляют активные в фотосинтезе растительные пигменты, в частности, хлорофилл *a*. В более глубоких местах в фонде пигментов преобладают продукты их деградации.

Хлорофилл в донных отложениях связан с первичной продукцией водоема: с концентрацией хлорофилла связана продуктивность водоемов, определяемая как способность создавать органическое вещество. В крупных водоемах основную часть первичной продукции формируют планктонные водоросли. Другие растительные сообщества в разной мере дополняют продукцию фитопланктона и в целом создают первичную продукцию водоема (или экосистемы). Первичную продукцию экосистемы оценивают по сумме первичной продукции всех автотрофов (фитопланктон, макрофиты, фитоперифитон и фитобентос, включая микрофитобентос). Растительные пигменты в экосистеме водоема количественно связаны с

первичной продукцией и процессами ее утилизации. Остатки молекулы хлорофилла, как и других растительных пигментов, сохраняются в составе органического вещества в донных отложениях любого водоема – с автотрофной и даже гетеротрофной направленностью метаболизма в водной экосистеме.

Отношение хлорофилла в донных осадках к конечной продукции. Конечной продукцией называют ту часть первичной (или вторичной) продукции, которая отчуждается от экосистемы природным или антропогенным способом на любом этапе ее формирования и трансформации. Величина антропогенного потребления продукции в наибольшей степени влияет на устойчивость экосистемы. Как правило, к конечным видам продукции относятся промысловые уловы рыб и других гидробионтов, включая растительные организмы, кроме того, вылетевшие насекомые, а также иловые отложения (Винберг, 1960). Хлорофилл может быть частью органического вещества (например, промысловых водорослей), принадлежащего конечной продукции экосистемы, независимо от биотопа, из которого оно изымается. Хлорофилл в донных отложениях относится к органическому веществу, которое тоже изымается, например, из экосистемы верхнего водного яруса на этапе седиментации. Пока это вещество находится в поверхностном активном слое, оно не является конечной продукцией по отношению ко всей экосистеме. Однако в дальнейшем органическое вещество, сохранившееся после частичной минерализации, оказывается заглубленным и изолированным от функционирующей экосистемы слоем осадков. В слое донных отложений, в котором затухают продукционные и деструкционные процессы, органическое вещество можно считать одним из видов конечной продукции, а растительные пигменты – ее индикаторами. Органическое вещество, относящееся к конечной продукции, находится ниже границы активного слоя. С увеличением возраста экосистемы толщина донных отложений увеличивается за счет седиментации взвеси из водной толщи, и нижние слои отложений изолируются от биотического круговорота. При этом общее содержание растительных пигментов и органического вещества, не участвующего в функционировании экосистемы, тоже увеличивается с возрастом водоема. Крайне низкие скорости трансформации пигментов сохраняются неопределенно долго.

Примечательно, что между содержанием растительных пигментов в среднегодовом слое донных отложений и рыбопродуктивностью водоема существует определенное соотношение как между показателями конечной продукции (Сигарева, 2006), обусловленное, по-видимому, упорядоченными взаимосвязями между звеньями пищевой цепи, компонентами экосистемы и абиотическими условиями (Винберг, 1960; Бульон, 1994).

Соотношение между концентрациями растительных пигментов в водной толще и донных отложениях отражает итог синтеза и деструкции новообразованного органического вещества, и прежде всего, итог работы фотосинтетического аппарата водорослей и трансформации их пигментов. Представления о соотношении между концентрациями пигментов в воде и отложениях важны для изучения механизмов формирования и утилизации первичной продукции в водоеме, для оценки эффективности использования консументами и редуцентами образованного при фотосинтезе органического вещества, а также для воссоздания экологических событий прошлого по сохранившейся в донных отложениях «летописи». Для концентраций пигментов в верхнем ярусе экосистемы в большей степени выражена временная изменчивость, тогда как в нижнем ярусе (донных отложениях) – динамика в пространстве. Главные причины в первом случае — сезонная динамика продуктивности фитопланктона, во втором – неоднородность грунтов. Тесная связь содержания пигментов в донных отложениях с глубиной станции и физико-химическими свойствами осадков дает основание считать, что характер варьирования концентрации осадочных пигментов зависит от абиотических условий осадконакопления – морфометрии водоема и интенсивности гидродинамической активности (Сигарева, 2010; Сигарева, Тимофеева, 2011).

Соотношение пигментов в воде и грунтах в разные сроки и на разных участках водоема – не константа, но его средние величины для водоема – одного порядка, и их изменения отражают роль фитопланктона в формировании продукционных свойств дна. Достаточно близкие для разнотипных водоемов средние величины этого отношения можно объяснить действием глобальных факторов, а также принадлежностью водоемов к единой системе,

характеризующейся сходными закономерностями формирования структуры донных отложений. Влияние земного притяжения обуславливает постоянную скорость оседания однотипных взвешенных веществ в озерах, а также сходные средние скорости накопления осадков в различных водоемах. Сходство скорости осадконакопления с величиной отношения средних концентраций хлорофилла в воде и донных отложениях объясняется не только участием растительной взвеси в формировании отложений, но и существованием закономерных количественных связей между продукционными и деструкционными процессами. Отклонения отдельных величин от среднего значения зависят от продуктивности водорослей и процессов осадкообразования, обусловленных, в свою очередь, особенностями экологической ситуации и морфометрических характеристик водоема.

Изложенные выше теоретические аспекты будут проиллюстрированы в докладе на примере итогов изучения фонда растительных пигментов (спектрофотометрическим методом) как одного из специфических подходов для получения информации об устойчивости экосистемы пресноводных экосистем Волги.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Алимов А.Ф. Продукционная гидробиология и функционирование экосистем // Новые идеи в океанологии. Т.1. Физика. Химия. Биология. 2004. М.: Наука. С.264–279.
2. Бульон В.В. Закономерности первичной продукции в лимнических экосистемах. 1994. СПб.: Наука. 222 с.
3. Винберг Г.Г. Первичная продукция водоемов. 1960. Минск: Изд-во АН БССР. 329 с.
4. Горшков В.Г. Пределы устойчивости окружающей среды // Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. № 4. С. 1015–1019.
5. Сигарева Л.Е. Формирование и трансформация фонда растительных пигментов в водоемах верхневолжского бассейна. Автореф. дис. на соиск. уч. степ. доктора биол. наук. 2006. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. 47 с.
6. Сигарева Л.Е. Содержание хлорофилла в воде и донных отложениях Рыбинского водохранилища // Биология внутр. вод. 2010. № 3. С.38–46.
7. Сигарева Л.Е., Тимофеева Н.А. Межгодовая динамика содержания хлорофилла *a* в донных отложениях Рыбинского водохранилища (Россия) // Альгология. 2011. Т. 21. № 2. С.190–201.
8. Reuss, N., Leavitt P.R., Hall R.I., Bigler C., Hammarlund D. Development and application of sedimentary pigments for assessing effects of climatic and environmental changes on subarctic lakes in northern Sweden // J. Paleolimnol. 2010. Vol. 43. P. 149–169.
9. Sigareva L.E., Timofeeva N.A. Sedimentary chlorophyll and pheopigments for monitoring of reservoir characterized by exclusively high dynamism of abiotic conditions. Chapter V // H. Le, E. Salcedo (eds.). Chlorophyll: Structure, Production and Medicinal Uses. 2011. N.Y.: Nova Science Publisher, Inc. P. 151–176.
10. Szymczak-Żyła M., Kowalewska G. Chloropigments *a* in sediments of the Gulf of Gdansk deposited during the last 4000 years as indicators of eutrophication and climate change // Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol. 2009. Vol. 284. P. 283–294.

PLANT PIGMENTS AS BIOMARKERS OF STABILITY FUNCTIONING OF FRESHWATER ECOSYSTEMS

Sigareva L.E.

Plant pigments are unique natural indicators, which reflect the processes of formation, migration, and transformation of organic matter. The characteristics of concentrations, composition, and state of plant pigments are used in attempts to establish the mechanisms of interaction between the processes of primary production and destruction in different water bodies. The work contains the results of studying of the spatial and temporal dynamics of content of chlorophyll and its degradation products in bottom sediments of some lakes and reservoirs of the Volga River. The relationships between the sedimentary chlorophyll content and phytoplankton productivity and sediment accumulation rates were found. The peculiarities of the sedimentary pigment distribution in relation with typological characteristics of bottom sediments and ecological zonality of the water body were revealed. The results are an addition to the concept of plant pigments as biomarkers in the study of freshwater ecosystems.

ОСОБЕННОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ МОРСКОГО ЕРША *SCORPAENA PORCUS L.*

Е.Н. Скуратовская, С.О. Шевчук

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ, Севастополь, Украина

E-mail: skuratovskaya2007@rambler.ru

Актуальной проблемой современных ихтиологических исследований является поиск информативных критериев оценки состояния рыб и среды их обитания, для чего разрабатываются специальные программы биомониторинга, основанные на концепции биоиндикаторов и биомаркеров (Руднева и др., 2010; Amando et al., 2006; Nahed, 2009). С этой целью используют различные молекулярные показатели, в том числе активность ферментов, среди которых особую роль играют холинэстеразы (ХЭ). В связи с ключевой ролью ХЭ в процессе передачи нервного импульса модуляция активности фермента под действием различных соединений является предметом исследования фармакологов, токсикологов, биохимиков. Определение активности ХЭ в сыворотке представляет наибольший клинический интерес для диагностики отравлений фосфорорганическими веществами и инсектицидами, а также как показатель состояния белок синтезирующей функции печени (Ковалев, 2003; Чуйко, Подгорная, 2007).

Большинство работ посвящено исследованию ХЭ пресноводных рыб. Однако, сведения, касающиеся удельной активности ХЭ в тканях и органах морских рыб, ограничены. В то же время установление зависимости активности ХЭ от таксономического положения вида и среды обитания морских гидробионтов представляет интерес для науки, позволяет определить стратегию биохимической адаптации холинэргических систем. На основании вышеизложенного цель настоящей работы заключалась в исследовании активности ХЭ в тканях морского ерша *Scorpaena porcus L.* из прибрежных акваторий г. Севастополя.

Объектом исследований служил морской ерш – биомониторный вид, широко используемый в экотоксикологических исследованиях (Руднева и др., 2010). Рыб отлавливали в бухтах г. Севастополя летом 2011 г.

Материалом для биохимических исследований служила сыворотка крови, супернатанты мозга, мышц, сердца, селезенки и печени. Кровь отбирали из хвостовой артерии, выдерживали сутки при температуре 4°C в холодильнике, затем получали сыворотку. Ткани рыб гомогенизировали в 0,85%-ном холодном растворе хлорида натрия, центрифугировали при 5000 g 15 минут. Для определения активности ХЭ использовали ацетилхолинхлорид в качестве субстрата. Активность фермента рассчитывали в пересчете на концентрацию белка. Содержание общего белка определяли биуретовым методом (Каталог инструкций..., 2005).

Статистическую обработку данных проводили по Лакину (Лакин, 1990). Вычисляли среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (σ), ошибку среднего арифметического (m). Сравнительный анализ данных осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между сравниваемыми рядами считали достоверными и статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований показали, что наибольшей холинэстеразной активностью обладает мозг рыб, что очевидно и согласуется с данными других исследователей (Ковалев, 2003; Чуйко, Подгорная, 2007). В мышцах активность ХЭ в 1,5 раза ниже, чем в мозге. В остальных тканях ферментативная активность незначительна и не имеет существенных отличий (рис. 1).

В дальнейшем был проведен сравнительный анализ холинэстеразной активности в печени и сыворотке крови морского ерша из бухт с разным уровнем загрязнения (Казачья, Карантинная, Стрелецкая). Согласно литературным данным, Стрелецкая бухта наиболее загрязнена, средней степенью загрязнения характеризуется бухта Карантинная, Казачья бухта является менее загрязненной (Кирюхина, Миронов, 2004; Осадчая и др., 2011). В результате исследований установлено снижение активности ХЭ в печени и сыворотке крови рыб с увеличением уровня загрязнения морской среды. Минимальная холинэстеразная активность выявлена у особей из Стрелецкой бухты (рис. 2).

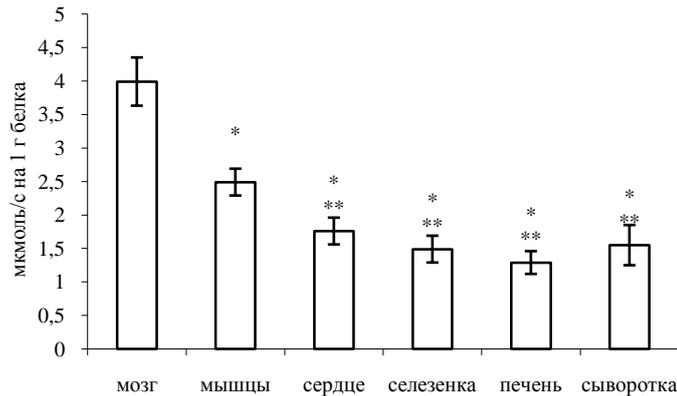


Рис. 1. Активность ХЭ в тканях морского ерша

Примечание: * - различия достоверны по сравнению со значениями в мозге; ** - то же по сравнению со значениями в мышцах при $p \leq 0,5$

В клинической диагностике снижение активности ХЭ в сыворотке крови отражает тяжесть и распространенность поражения гепатоцитов, а также является следствием белковой недостаточности в результате нарушения белоксинтетической функции печени (Зайко, Быць, 1996).

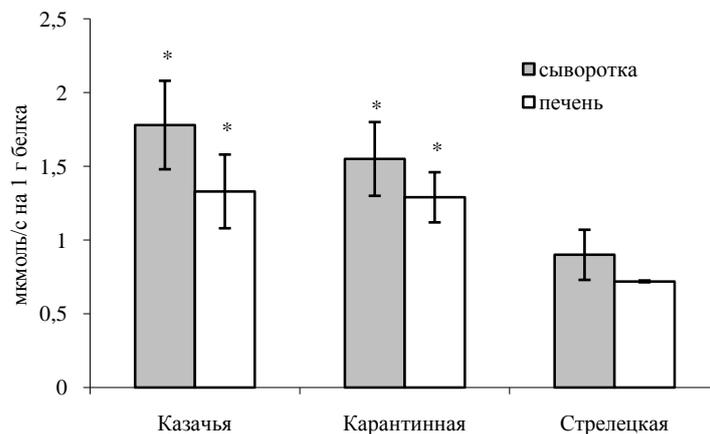


Рис. 2. Активность холинэстеразы в сыворотке крови морского ерша из разных бухт. * - различия достоверны по сравнению со значениями рыб из Стрелецкой бухты

Вероятно, снижение активности ХЭ в печени и сыворотке морского ерша из Стрелецкой бухты является следствием нарушения работы органа в результате попадания в организм высоких концентраций токсикантов. Данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о снижении холинэстеразной активности в тканях рыб из районов с высоким уровнем загрязнения в результате ингибирования фермента токсикантами (Nahed, 2009).

Известно также, что ХЭ являются биомаркерами загрязнения фосфорорганическими соединениями. При отравлении фосфорорганическими пестицидами происходит ингибирование активности ХЭ, и как одно из следствий – блокада холинэргических синапсов (Чуйко, Подгорная, 2007). Снижение активности ХЭ в печени и сыворотке крови рыб из Стрелецкой бухты может быть обусловлено загрязнением морской среды фосфорорганическими пестицидами. Ежедневно в Стрелецкую бухту поступает 350 м^3 сточных вод, содержащих различные токсиканты, в том числе пестициды, что отражается на состоянии рыб и вызывает ингибирование ферментативной активности.

Таким образом, в результате исследований выявлена тканевая специфичность холинэстеразной активности морского ерша. Установлено снижение активности ХЭ в печени и сыворотке крови рыб с увеличением уровня загрязнения морской среды. Активность ХЭ тканей морского ерша можно рекомендовать наряду с другими параметрами в качестве биомаркеров в экотоксикологических исследованиях и мониторинговых программах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Зайко Н.Н., Быць Ю.В. Патологическая физиология. К.: "Логос", 1996. 646 с.
2. Каталог инструкций: Диагностические наборы реактивов для клинических биохимических и микробиологических исследований. Днепропетровск: Филисит-диагностика, 2005. 199 с.
3. Кирюхина Л.Н., Миронов О.Г. Химическая и микробиологическая характеристика донных осадков севастопольских бухт в 2003 г. // Экология моря. 2004. Вып. 66. 53 – 58.
4. Ковалев Н.Н. Холинэстеразы - биохимические механизмы адаптации гидробионтов: дисс. ... доктора биологических наук: 03.00.16, 03.00.04 Владивосток, 2003. 280 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Осадчая Т.С., Алемов С.В., Тихонова Т.А. Антропогене воздействие на прибрежные акватории Чёрного и Азовского морей // Состояние экосистем шельфовой зоны Чёрного и Азовского морей в условиях антропогенного воздействия: сб. ст. 2011. С. 109 – 118.
7. Руднева И.И., Скуратовская Е.Н., Омельченко С.О. Межгодовая динамика активности антиоксидантных ферментов крови морского ерша, отловленного в Севастопольской бухте в период 2001 - 2004 гг. // Экологические системы и приборы. 2010. № 12. С. 53 – 57.
8. Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Холинэстеразы пресноводных костных рыб // физиология и токсикология пресных животных. Рыбинск, 2007. С. 100 – 139.
9. Amando L.L., Robaldo R.B., Geracitano L., et al. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil) // Mar. Pollut. Bull. 2006. Vol. 52. P. 207 – 213.
10. Nahed S.G. Determination of glutathione related enzymes and cholinesterase activities in *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariehinus* as bioindicator for pollution in lake Manzala // Glob. Vet. 2009. Vol. 3 (1). P. 37 – 44.

PECULIARITIES OF CHOLINESTERASE ACTIVITY OF SCORPION FISH *SCORPAENA PORCUS* L. TISSUES

E.N. Skuratovskaya, S.O. Shevchuk
The Institute of Biology of the Southern Seas, Ukraine

Peculiarities of cholinesterase activity of scorpion fish *Scorpaena porcus* L. was studied. The tissue specificity of cholinesterase activity was observed. The decrease of liver and serum HE activity in fishes with increase of marine pollution level was established. The application of this parameter as a biomarker in ecotoxicological researches and monitoring programs is discussed.

КАРДИОАКТИВНОСТЬ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АДАПТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ РАКОВ *CHERAX QUADRICARINATUS*, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

Сладкова С.В., Удалова Г.П., Холодкевич С.В.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский Центр экологической безопасности Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: sladkova_sv1@mail.ru

В настоящее время широкое распространение получили биологические методы оценки качества воды, в которых в качестве тест-организмов используются разные виды животных, а биомаркерами служат физиологические показатели их жизнедеятельности. Среди них достаточно эффективными являются методы, основанные на неинвазивной регистрации и анализе в реальном времени кардиоактивности декапод и моллюсков (Depledge, 1984; Vamber, Depledge, 1997; Холодкевич, 2006, 2007; Kholodkevich et al. 2008). Очевидно, что при отборе тест-организмов, пригодных для использования в системах биоиндикации, необходимо учитывать адаптационные возможности вида, способность приспосабливаться к экспериментальной среде и условиям, зачастую весьма отличающимся от естественных.

В настоящей работе исследовались адаптивные изменения кардиоактивности раков *Cherax quadricarinatus*, культивируемых в лаборатории в целях их использования в производственной системе биомониторинга в реальном времени токсикологической безопасности биологически очищенных сточных вод (БОСВ) и последующей оценки хронического воздействия БОСВ на функциональное состояние раков.

Начальный этап исследования проводился в чистой воде в лабораторных условиях и включал отбор животных для использования их в качестве тест-организмов в биоэлектронной системе непрерывного контроля качества БОСВ, как среды обитания гидробионтов на Юго-Западных очистных сооружениях ГУП «Водоканал Санкт_Петербурга» (ЮЗОС). Такая система находится в производственной эксплуатации на ЮЗОС с 2010 года. Кроме инструментальных физико-химических методов анализа, система включает аппаратное обеспечение для регистрации и обработки хронотропных характеристик кардиоактивности раков двух видов *Astacus leptodactylus* и *Cherax quadricarinatus*, используемых в биоэлектронных системах биомониторинга в качестве тест-организмов (Мельник и др., 2012). Для этого отбирали недавно перелинявших половозрелых раков-самцов, размером более 9 см, без признаков заболеваний. Об удовлетворительном физиологическом состоянии животных первоначально судили по их подвижности, потреблению корма и чётко выраженной реакции опистотонуса. Более детально функциональное состояние раков исследовали по характеристикам кардиоактивности, используя специально разработанные методики (Отчет по НИР НИЦЭБ РАН: № госрегистрации 01.2.00900.885; Удалова и др., 2009; Кузнецова и др. 2010). На карапакс раков над областью сердца приклеивали миниатюрный держатель, в который вставляли волоконно-оптический датчик, соединённый с системой регистрации и анализа кардиоактивности. ЧСС записывали одновременно у шести раков в течение длительного времени. Метод измерения и компьютерные программы автоматического анализа регистрируемых фотоплетизмограмм позволяли определять в реальном времени характеристики variability кардиоритма: ЧСС (уд/мин), среднее квадратичное отклонение длительности кардиоинтервалов (SD в секундах) и стресс-индекс (SI в условных единицах) (Kholodkevich et al., 2008). Полученный материал обрабатывали традиционными статистическими способами (Стьюдент-Фишер, хи-квадрат), считая различия сравниваемых величин достоверными при $p \leq 0.05$. Среди разработанных и апробированных нами критериев функционального состояния раков использовались следующие: наличие стабильного околосуточного ритма ЧСС и тест на подвес (Удалова и др., 2009).

После такого тестирования шесть отобранных раков помещали в качестве тест-организмов в биоэлектронную систему производственного биологического мониторинга качества БОСВ. В каждом из шести проточных аквариумов установки находился один рак. В течение всех 6 месяцев обеспечивалось постоянное освещение аквариумов в режиме 12С/12Т. Животных кормили мороженым мотылём и растительным кормом раз в трое суток *ad libidum*. В естественных условиях раки *Cherax quadricarinatus* адаптированы к существованию при относительно высоких температурах, поэтому они использовались на ЮЗОС с мая по октябрь, когда температура БОСВ изменялась в диапазоне 20-35°C. В ноябре раков перемещали в лабораторные аквариумы с отстоянной водопроводной водой и оценивали их функциональное состояние после длительного, хронического воздействия на них БОСВ, используя те же тесты, что и на первом этапе.

Результаты проведённого исследования показали, что всевозможные манипуляции (наклеивание датчика, помещение в аквариум и т.п.) вызывают у раков стрессовую реакцию, проявляющуюся в возникновении отчётливого двигательного-оборонительного поведения, сопровождавшегося быстрым повышением ЧСС приблизительно в 2,5 раза по сравнению с ЧСС в покое. После помещения раков в экспериментальные аквариумы такое максимальное повышение ЧСС, сохранявшееся даже после хэндлинга, могло продолжаться до 60 минут (53.3 ± 5.8 ; $n=6$). Такая первичная реакция со стороны кардиоактивности наблюдалась нами как на начальном этапе исследования, так и при перемещении их в лабораторию после экспозиции в БОСВ (рис1).

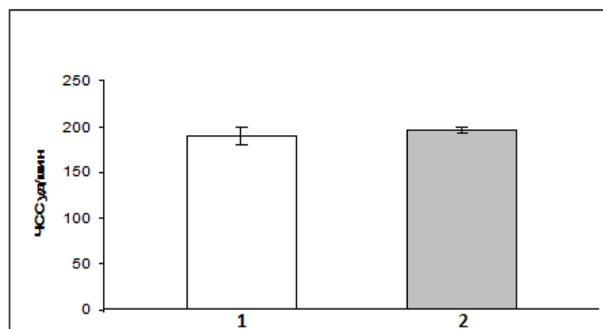


Рис 1. Значения ЧСС у 6 раков, помещённых в аквариум после хэндлинга, до (1) и после воздействия БОСВ (2).

Анализ кардиоактивности раков в первые дни нахождения в лаборатории показал, что в это время животные находятся в состоянии выраженного возбуждения, о чем свидетельствует, в частности, повышенный на 20-30% уровень ЧСС покоя, т.е. в дневное время, по сравнению с таковой, характерной для раков этого вида, размера и возраста. Затем ЧСС покоя снижается до 50-60 уд/мин в зависимости от индивидуальных особенностей раков, при этом характерный для данного вида циркадианный кардиоритм еще не выявляется (рис. 2).

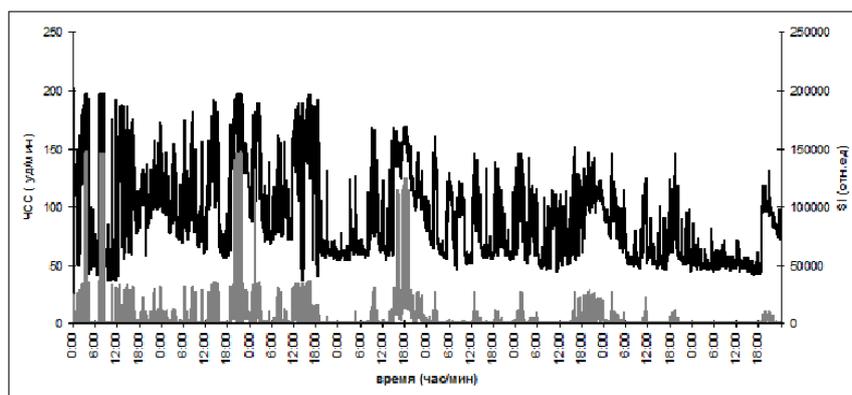


Рис.2. Запись в течение 8 суток кардиоактивности рака, начиная с первых суток помещения его в экспериментальный аквариум. Верхняя кривая – ЧСС, нижняя – SI.

У всех особей, отобранных для биоиндикации БОСВ, этот ритм возникал и стабилизировался только на 12-14 сутки после помещения раков в аквариумы (рис.3). Ритм имел следующие характеристики: регулярная ночная активность длительностью более 8 часов со значениями ЧСС в диапазоне 100-180 уд/мин, а в покое - 50- 60 уд/мин.

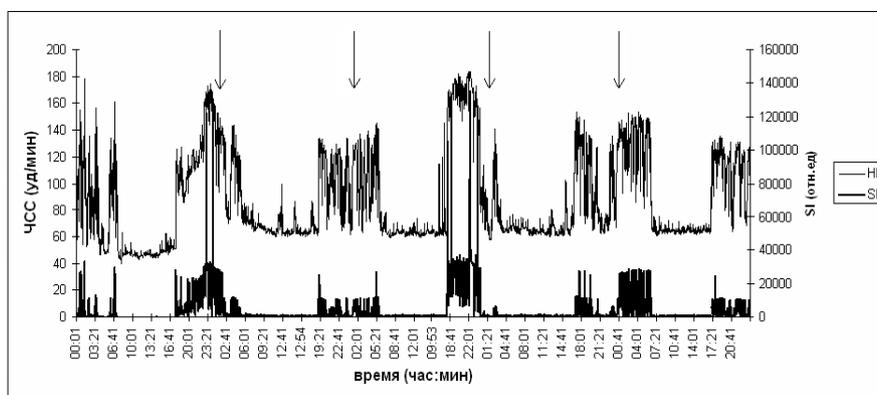


Рис. 3. Типичный пример циркадианного кардиоритма у раков *Cherax quadricarinatus*, адаптированных к условиям содержания (запись в течение 5 суток).

Установление типичной для данного вида раков циркадианной ритмики с чередованием дневного периода покоя и ночной активности является показателем торможения оборонительного поведения и закрепления естественного суточного цикла, т.е. акклимации к новым для животного условиям среды.

На этом фоне проводили специальный тест, определяя реакцию рака на стрессовое, но не травмирующее воздействие. Для этого рака за закреплённый на его карапаксе оптоволоконный кабель на час подвешивали в толще воды, лишая его контакта с дном аквариума. Типичная реакция животного, находившегося в удовлетворительном физиологическом состоянии, проявляется в быстром повышении ЧСС (на 100% и более) и стресс-индекса, поддержании этого уровня во время подвеса и в быстром (в течение 30-60 мин) их снижении до первоначального уровня. Такая реакция, по-видимому, свидетельствует о нормальном энергетическом статусе животного (Bamber, Depledge, 1997).

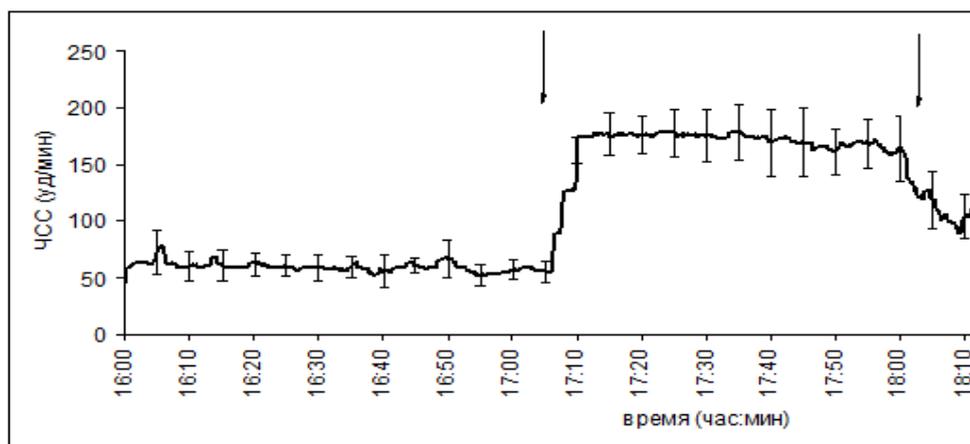


Рис. 4. Динамика ЧСС 6 раков в тесте на подвес. Стрелками указано начало и конец воздействия.

Таким образом, исследование кардиоактивности раков *Cherax quadricarinatus* показало, что её характеристики после длительной экспозиции в БОСВ соответствовали наблюдавшимся в чистой воде лаборатории на первом этапе экспериментов. Следовательно, шестимесячная экспозиция раков в неразбавленной БОСВ не оказала заметного хронического токсического воздействия на состояние животных. В ходе проведённого исследования были выявлены, по крайней мере, три фазы адаптивных реакций раков:

1) Первичная кратковременная оборонительная реакция. В ответ на новые условия среды или стрессовое кратковременное воздействие (хэндлинг, тест на подвес) наблюдались выраженные поведенческие реакции и изменения хронотропных характеристик кардиоактивности с постепенным восстановлением их до исходного состояния;

2) Период акклимации (около двух недель), характеризующийся процессами нормализации поведения раков и соответствующих характеристик кардиоактивности;

3) Последующий период адаптации раков к условиям нахождения в лабораторной чистой воде (относительно невысокие значения ЧСС в покое, отчётливая циркадианная кардиоритмика).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при многомесячной экспозиции раков в БОСВ они адаптируются к качеству среды, сохраняя при этом удовлетворительное физиологическое состояние.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Кузнецова Т.В., Сладкова С.В., Холодkevич С.В. Оценка функционального состояния раков в нормальной и токсической среде по их кардиоактивности и биохимическим показателям гемолимфы // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2010, Т. 46, № 3, С. 203-210.
2. Мельник Е.А., Рублевская О.Н., Панкова Г.А., Холодkevич С.В., Иванов А.В., Корниенко Е.Л., Сладкова С.В., Любимцев В.А., Куракин А.С. Биоэлектронная система контроля токсикологической безопасности биологически очищенных сточных вод, сбрасываемых Юго-

- Западными очистными сооружениями ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» в Невскую губу // Водоснабжение и санитарная техника, 2012, № 4.
3. Отчет по НИР НИЦЭБ РАН: «Разработка методов биомониторинга экологической опасности водных объектов на основе инструментальных методов контроля качества поверхностных вод и донных отложений в реальном времени» (№ государственной регистрации 01.2.00900.885).
 4. 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. // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2009. Т.45, № 3, С.304-312.
 5. Холодкевич С.В. Волоконно-оптические дистанционные биосенсорные системы непрерывного биологического мониторинга качества поверхностных вод и донных отложений в реальном времени // Нефть и газ арктического шельфа – 2006: Материалы международной конференции. Мурманск, 15-17 ноября. Мурманск: ММБИ КНЦ РАН, 2006. С. 287-296.
 6. Холодкевич С.В. Биоэлектронный мониторинг уровня токсичности природных и сточных вод в реальном времени // Экологическая химия. 2007. Т.16 (4). С.223-232.
 7. Bamber S.D., Depledge M.H. Responses of shore crabs to physiological challenges following exposure to selected environmental contaminants // Aquatic Toxicology. 1997. V. 40. pp. 79-92.
 8. Depledge M.H. Disruption of circulatory and respiratory action in shore crabs *Carcinus maenas* (L.) exposed to heavy metal pollution // Comp. Biochem. Physiol. 1984. V.78. pp. 445-459.
 9. 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 // J. Environmental Bioindicators, 2008, V. 3, № 1, pp. 23-34.

CARDIAC ACTIVITY AS INDICATOR OF ADAPTIVE PROCESSES OF THE CRAYFISH *CHERAX QUADRICARINATUS*, USED FOR BIONDICATION OF TREATED SEWAGE QUALITY

Sladkova S.V., Udalova G.P., Kholodkevich S.V.

It were investigated the adaptive changes of cardiac activity of crayfish *Cherax quadricarinatus* cultivated in a laboratory for using as test-object at multimonhly control in real time of toxicological safety of biologically treated sewage (BTS). Analysing by means of the worked out tests of HR changes, the functional state of crayfish determined before and after the display of animals in BTS. During undertaken a study three phases of adaptability reactions of crayfish appeared. It is shown that the prolonged exposure of crayfish in BTS substantially did not influence on their ability to adapt oneself to quality of environment. The crayfish maintained of the satisfactory physiological status and demonstrated adequate reactions during the laboratory testing before and after BTS influence.

ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ГИДРОБИОНТОВ

А.А. Солдатов

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины
Севастополь, Крым, Украина, alekssoldatov@yandex.ru*

Необходимость рассмотрения данного вопроса возникла в связи с невозможностью использовать в полном объеме действующую систему классификации гипоксических состояний, принятую для организма человека (Колчинская, 1981) в отношении гидробионтов. Это обусловлено тем, что воздушная и водная среды принципиально отличаются по физико-химическим свойствам, что требует пересмотра экзогенных форм гипоксии. Гидробионты используют иные респираторные поверхности (жабры) и типы их вентиляции (насосный, таранный). Их функциональные и молекулярные системы транспорта и утилизации кислорода зависят от температуры среды, что не свойственно гомойотермным организмам. У ряда водных животных отсутствуют отдельные функциональные и молекулярные системы, что накладывает отпечаток на механизмы регуляции кислородного гомеостаза тканей. Рассмотренные выше особенности водной среды и функциональной организации гидробионтов позволили пересмотреть действующую систему классификации гипоксических состояний применительно к водным организмам (рис 1).

В основу предлагаемой классификации положены представления о первичной и вторичной гипоксии (Колчинская, 1981). Первичные формы гипоксии (гистотоксический тип) связываются с неспособностью молекулярных систем тканей утилизировать O_2 в количестве достаточном для полноценного ресинтеза АТФ: дефицит субстратов окисления, недостаточность окисления, нарушение окисления, разобщение окисления и фосфорилирования (Романенко и др., 1991; Blier, Lemieux, 2001). Они являются общими для водных и наземных организмов.

Ко вторичной гипоксии отнесены состояния, развивающиеся на основе несоответствия доставки кислорода величинам его потребления тканевыми структурами. Среди них выделены экзогенные, эндогенные и локомоторные формы.

Экзогенная гипоксия развивается в результате внешнего дефицита кислорода при сохранении функциональной полноценности физиологических и молекулярных систем его транспорта и утилизации. Механизмы возникновения экзогенных форм гипоксии в водной среде принципиально иные. Скорость диффузии кислорода в воде в 10000 раз менее эффективна, чем в воздухе. Поэтому любые факторы, негативно влияющие на водообмен или растворимость кислорода могут приводить к возникновению внешней гипоксии. На этом основано выделение 4-х основных видов экзогенной гипоксии: ограничение водообмена, эвтрофикация, гипертермия и гиперосмия.

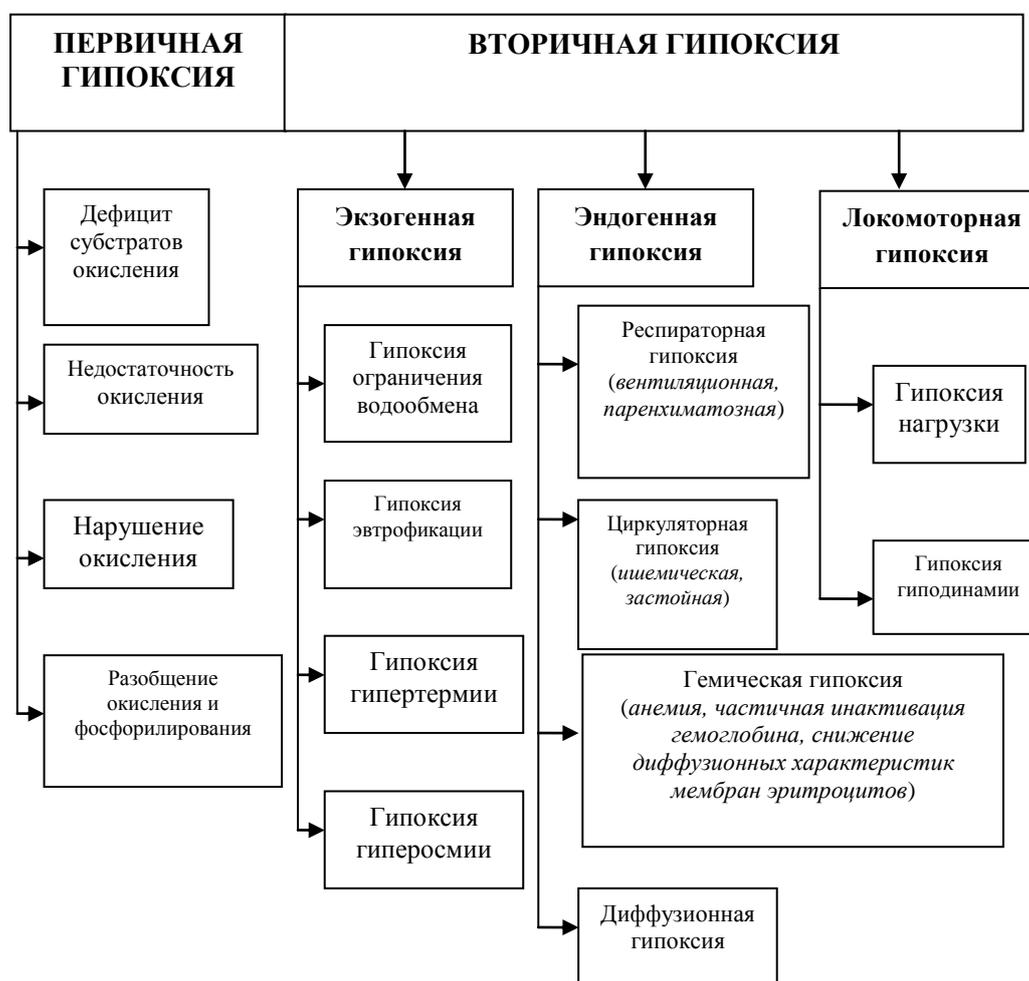


Рис. 1. Общая классификационная схема гипоксических состояний гидробионтов

Гипоксия ограничения водообмена. Низкая скорость диффузии кислорода в воде означает, что без эффективного конвективного и турбулентного перемешивания распространение кислорода в водной среде невозможно. Поэтому любое ограничение водообмена сопровождается относительно быстрым понижением его концентрации в воде. Особенно актуально это для шельфовой зоны, в которой наблюдается наиболее высокий уровень биологического потребления кислорода. Придонная гипоксия и аноксия являются

достаточно распространенным явлением в водах Мирового океана. Это качество в большей степени присуще шельфу Тихого океана, где гипоксия наблюдается на 25 % его территории (Joуce, 2000). Организмы, обитающие здесь, особенно малоподвижные формы, вынуждены постоянно существовать в условиях острого дефицита кислорода и даже аноксии (Joуce, 2000).

Гипоксия эвтрофикации. Эвтрофикация – широко распространенное явление в прибрежных водах Мирового океана и континентальных водоемах. В основе эвтрофикации лежит нарушение баланса веществ в экосистемах, связанное с избыточным поступлением в водную среду биогенов (азота, фосфора, кремния, железа и др.) преимущественно антропогенного происхождения (Joуce, 2000). Это приводит к повышению уровня трофности, следствием которой является чрезмерное усиление первичной продукции в экосистемах. Внешне она часто проявляется в форме цветения акваторий и водоемов, что связано с прогрессирующим развитием некоторых групп цианобактерий (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* и др.). В конечном итоге это сопровождается значительным увеличением биологического потребления кислорода и постепенным развитием внешней гипоксии. Организмы высших трофических уровней, обитающие в этих условиях, фактически постоянно испытывают острую нехватку кислорода.

Гипертермическая гипоксия. С повышением температуры коэффициент абсорбции и растворимость кислорода в воде уменьшаются. В диапазоне физиологически значимых температур – 0-30°C снижение составляет почти 2 раза. Эта зависимость может стать причиной возникновения внешнего дефицита кислорода. Она актуальна для мелководных естественных (лагуны, лиманы, пойменные озера) и искусственных (бассейны, пруды, рисовые чеки) водоемов и водотоков с неустойчивым суточным температурным режимом. Эта ситуация в определенной степени может быть экстраполирована и на литоральные и сублиторальные зоны шельфа. Значительные скачки температуры могут возникать и при тепловодном выращивании рыбы в момент сброса термальных вод (термофикация) ТЭС и АЭС в водоемы-охладители или непосредственной подачи горячих геотермальных вод в выростные пруды.

Гиперосмическая гипоксия. Данный вид экзогенной гипоксии следует рассматривать скорее как теоретически возможный, нежели реально существующий. Он основан на том, что при повышении солёности растворимость кислорода в воде снижается. Однако эта зависимость выражена в меньшей степени, чем в отношении температуры. Так, при повышении солёности в диапазоне 0-40 ‰ растворимость кислорода при 20°C уменьшается в средней только на 25 %. Поэтому роль данного фактора в развитии внешней гипоксии актуальна в основном для гиперсолёных водоемов (солёность более 40 ‰). Определённый кислородный дефицит, вероятно, могут испытывать и проходные рыбы при переходе из пресных водоемов в морские акватории. Непосредственное введение геотермальных вод в пресноводные выростные пруды может также привести к росту солёности и повлиять на их кислородный режим, так как вода скважин имеет не только высокую температуру, но и обычно значительную солёность.

Эндогенные формы вторичной гипоксии связаны с изменением состояния систем кислородного обеспечения организма. Они сопровождаются понижением артериального PO_2 или ограничением массопереноса кислорода к тканям и включают респираторный, циркуляторный и гемический компоненты. В настоящей классификационной схеме впервые выделяется диффузионная гипоксия, а также ряд новых видов гемической и циркуляционной (ишемической) гипоксии.

Диффузионная гипоксия отмечена в гипоосмотических условиях морской среды у стеногалинных рыб (Солдатов, 2012). Она сопровождалась гидратацией мышечной ткани, снижала ее диффузионную способность по отношению к кислороду и приводила к уменьшению тканевого PO_2 и усилению анаэробных процессов в ткани.

Циркуляционная (ишемическая) гипоксия отмечена у теплолюбивых рыб в условиях гипотермии (менее 5°C) (Солдатов, 2010). Сосуды мышц у них утрачивали способность активно реагировать на функциональные нагрузки, что было связано с повышением содержания Ca^{2+} в мышечной ткани. Это приводило к неконтролируемой вазоконстрикции, снижению плотности капиллярной сети, росту диффузионных расстояний, уменьшению тканевого PO_2 и повышению содержания лактата в тканевых структурах.

Новые виды гемической гипоксии были связаны с развитием необычных форм анемии и с чрезмерным ростом сродства гемоглобина к кислороду.

- Случаи анемии были описаны у рыб в преднерестовый период и в условиях гипоосмии (Солдатов, 2005, 2012). В обоих случаях они определялись снижением числа эритроцитов в крови. Преднерестовая анемия была обусловлена старением эритроцитарной массы в виду нерегулярности эритропоэтических процессов в кроветворной ткани. Она дополнялась развитием метгемоглобинемии. В условиях гипоосмии наблюдали свеллинг и последующий лизис части циркулирующих эритроцитов.
- Чрезмерный рост сродства гемоглобина к кислороду отмечен у теплолюбивых рыб в условиях гипотермии (Солдатов, Парфенова, 2011). Тепловой эффект реакции оксигенации гемоглобина при температурах менее 5°C повышался более, чем в 4 раза. Последнее осложняло разрядку оксигемоглобина и сопровождалось снижением тканевого PO_2 .

В предлагаемой схеме классификации гипоксических состояний впервые вносится термин «локомоторные формы гипоксии». Они возникают на основе рассогласования процессов доставки и потребления кислорода тканями при изменении величины двигательной активности организмов. Для гидробионтов, наряду с выделением гипоксии нагрузки, в настоящей схеме впервые предлагается рассмотреть и гиподинамический вариант гипоксии, развивающийся на основе ограничения фоновой двигательной активности животных. Данный вид гипоксии характерен для рыб, использующих в той или иной степени таранный тип вентиляции респираторных поверхностей (Bushnell, Jones, 1994). В наших работах он был отмечен у пиленгаса в условиях садкового выращивания (Солдатов, Парфенова, 2009). При ограничении подвижности у этого вида увеличивалось число гипоксических и аноксических зон в мышечной ткани, происходила и переориентация тканевого метаболизма в сторону усиления анаэробных процессов.

Таким образом, материалы, представленные в настоящей работе, позволяют заключить, что действующая система классификации гипоксических состояний не может быть в полном объеме экстраполирована на организм гидробионтов. Она требует существенной корректировки с учетом физико-химических особенностей водной среды и функциональной организации первичноводных организмов. В настоящей работе впервые предлагаются пути ее адаптации к водным формам жизни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колчинская А.З. О классификации гипоксических состояний // Патол. физиология эксперим. терапия. 1981. Вып. 4. С. 3-10.
2. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклимации рыб. К.: Наук. думка, 1991. 192 с.
3. Солдатов А.А. Массоперенос, утилизация и диффузия кислорода в скелетных мышцах стеногалянного *Gobius cobitis* Pallas в условиях гипоосмотической среды // Ж. эволюц. биохим. физиол. 2012. Т. 48, № (в печати).
4. Солдатов А.А. Эритропоэз и концентрация метгемоглобина в крови кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) на протяжении годового цикла // Совр. пробл. физиол. биохим. водн. организмов. Петрозаводск: Изд-во Ин-та биологии, КарНЦ РАН, 2005. С. 182-187.
5. Солдатов А.А. Влияние экспериментальной гипотермии на состояние капиллярной сети скелетных мышц морских рыб // Совр. пробл. физиол. биохим. водных организмов. Сб. научн. статей. Т. 1. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. С. 278-282.
6. Солдатов А.А., Парфенова И.А. Развитие тканевой гипоксии у кефали-пиленгаса в условиях садкового содержания // Рыбне хозяйство. 2009. Вып. 66. С. 180-184.
7. Солдатов А.А., Парфенова И.А. Связывание кислорода кровью морских рыб в условиях экспериментальной гипотермии // Укр. биох. журн. 2011. Т.83, N1. С. 77-82.
8. Blier P.U., Lemieux H. The impact of the thermal sensitivity of cytochrome *c* oxidase on the respiration rate of Arctic char red muscle mitochondria // J. Comp. Physiol. 2001. Vol. 171, N 3. P. 247-253.
9. Bushnell P.G., Jones D.R. Cardiovascular and respiratory physiology of tuna: Adaptations for support of exceptionally high metabolic rates // Environ. Biol. Fishes. 1994. Vol. 40, N 3. P. 303-318.
10. Joyce S. The dead zones: oxygen-starved coastal waters // Environ. Health Perspective. 2000. Vol. 108, N 3. P. A120-A125.

PRINCIPLES OF HYPOXIC STATES CLASSIFICATION OF HYDROBIONTS

A.A.Soldatov

*Institute of Biology of the Southern Seas of NASU
Sevastopol, Crimea, Ukraine, alekssoldatov@yandex.ru*

Data on the mechanisms of hypoxic state development in initial water organisms were summarized. The ways of modification of modern classification of hypoxic states were proposed on the base of primary and secondary hypoxia conceptions. New types of exogenous, hemic, locomotory and diffusion hypoxia attributed to predominantly water life forms were considered.

АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ ОЗЕРА ЧАНЫ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

¹Соловьев М.М., ¹Кашинская Е.Н., ²Извекова Г.И.

¹*Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

²*Институт биологии внутренних вод РАН, пос. Борок, Россия*

E-mail: yarmak85@mail.ru

Пищеварение – ключевой процесс в метаболизме большинства видов животных, поскольку обеспечивает организм всеми необходимыми веществами для нормального роста и развития (Уголев, 1985). Известно, что структурно-функциональная организация животных и, в частности, рыб изменяется в процессе онтогенеза. Подобные изменения характерны, в том числе, и для пищеварительной системы. Онтогенетические изменения пищеварительной системы отражаются как на ее морфологии, так и на физиологических функциях. В частности это сказывается на активности пищеварительных гидролаз. На стадии эмбриона, или в первые дни после выклева из икры у личинок рыб можно обнаружить активность большинства пищеварительных гидролаз, которые в течение онтогенеза претерпевают видоспецифичные изменения. На уровень активности и спектр пищеварительных ферментов молоди рыб в естественных условиях может оказывать влияние множество факторов как биотической, так и абиотической природы. Один из таких факторов – изменяющийся в течение онтогенеза спектр питания.

В Чановской системе озер в течение вегетационного периода происходят существенные изменения в численности и биомассе различных комплексов водных беспозвоночных, входящих в рацион рыб. В Чановской системе озер обитает 14 видов пресноводных костистых рыб, которых по типу питания можно условно разделить на хищных (судак *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758), щука *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), окунь *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758)) и мирных (лещ *Abramis brama* (Linnaeus, 1758), сазан *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), плотва *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), елец *Leuciscus leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1874)). Внутри этих групп также возможно выделение облигатных и факультативных хищников, планктофагов, бентофагов и всеядных рыб. Наличие специализированных по питанию групп рыб в пределах одного водоема – удобная модель для изучения связи активности и спектра кишечных гидролаз с типом питания рыб.

В связи с этим цель работы – изучение активности и спектра кишечных гидролаз в онтогенезе некоторых пресноводных костистых рыб с различной пищевой специализацией в оз. Чаны.

Сбор материала проводили в апреле–августе 2009 г. и апреле–сентябре 2010 г. в устье реки Каргат (бассейн оз. Чаны, Западная Сибирь). Отлов предличинок и личинок рыб осуществляли сачком из мельничного газа. Отлов ранних мальков и сеголеток проводили мальковым бреднем. Этапы развития молоди даны по Васнецову (Васнецов, 1957).

Для определения активности ферментов кишечник рыб полностью вырезали, освобождали от пищевого комка, и затем гомогенизировали ручным гомогенизатором в 100 мкл 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 9). На этапах развития В, С1 и С2 готовили суммарную пробу из 30–50 кишечников, на этапе D2 – из 3–6 кишечников. Для разбавления гомогената добавляли 900 мкл 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 9). Гомогенаты кишечников центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут. Супернатант использовали для определения активности ферментов. Суммарную активность протеиназ (КФ 3.4.) определяли, как описано у Аларкон с соавторами (Alarcón *et al.*, 2002) с 0.3% азо-казеина в 0.1 М Tris-HCl буфере (pH 9) в качестве субстрата,

при температуре 25°C, в течение 30–60 минут. Активность α -амилазы (КФ 3.2.1.1) определяли методом Бернфелда (Deguaga *et al.*, 2003) с растворимым крахмалом (1% в буфере Tris-HCl, pH 9) в качестве субстрата, инкубацию проводили при температуре 25°C в течение 5–60 минут в зависимости от размера рыб. Активность липазы (неспецифические липазы КФ 3.1.1) определяли методом Албро с соавторами (Gawlicka *et al.*, 2000) с 4-нитрофенил-мирилатом (0,4 мМ) в качестве субстрата в аммоний бикарбонатном буфере 24 мМ (pH 9) с добавлением тритона X-100 (0.5%) при температуре 25°C в течение 10–40 минут. Активность эстераз (неспецифические эстеразы КФ 3.1.1) определяли как описано у Прабхакаран (Prabhakaran, Kamble, 1995) с *p*-нитрофенилацетатом (0.27 мМ в 0.1М фосфатном буфере с 150 мМ NaCl, pH 9) в качестве субстрата при температуре 25°C в течение 5–25 минут. Удельную активность ферментов выражали как специфическую активность в единицах изменения оптической плотности (ΔA) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 минуту и 1 мг белка. Для щелочных протеаз – А 440 нм/мг×мин, для α -амилазы – А 540 нм/мг×мин, для неспецифических липаз – А 405 нм/мг×мин, для неспецифических эстераз – А 410 нм/мг×мин. Далее на графиках специфическая активность обозначена как условные единицы. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976) при 595 нм. Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин. Данные на графиках представлены в виде среднего значения и его ошибки. Обработка результатов выполнена с помощью статистического пакета Statistica 6.

Для исследованных видов мирных рыб установлены сходные закономерности развития и становления активности щелочных протеаз кишечника. На этапах развития В–Е активность щелочных протеаз незначительна, затем у серебряного карася на этапах Е–F, у плотвы и ельца на этапах Е–G (размерная группа 20–30 мм) происходит ее резкое увеличение, а в дальнейшем стабилизация или некоторое снижение (рис. 1). У судака начиная с этапа Е и окуня с этапа F до этапа G (размерная группа 30–40 мм) наблюдается значительное увеличение активности щелочных протеаз (рис. 1). На этапе развития F и в размерной группе 20–30 мм активность щелочных протеаз у окуня достоверно ниже, чем у судака.

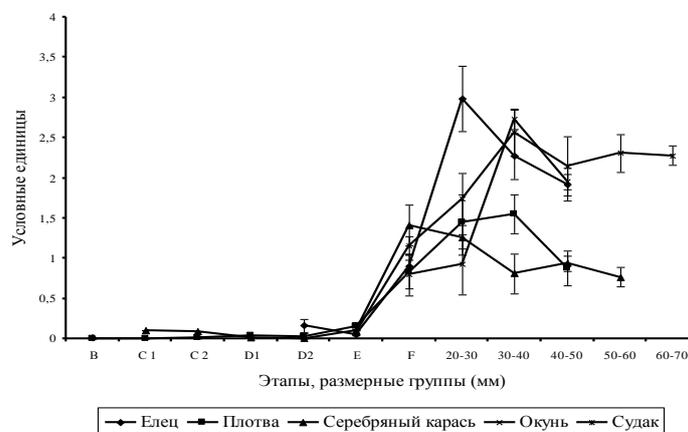


Рис. 1. Общая активность щелочных протеаз в кишечнике мирных и хищных рыб на разных этапах онтогенеза в оз. Чаны.

Для мирных и хищных видов рыб, как и в случае щелочных протеаз, установлены сходные закономерности развития и становления активности α -амилазы кишечника. Для ельца, плотвы и серебряного карася характерна незначительная активность α -амилазы на этапах В–Е. У серебряного карася не выявлена активность α -амилазы на этапах С1, С2 и D2. Начиная с этапа Е у всех рыб значительно увеличивается активность α -амилазы. У ельца это происходит в размерной группе 30–40 мм, у плотвы и серебряного карася – в группе 20–30 мм. Затем наблюдается стабилизация или незначительное снижение активности α -амилазы (рис. 2). У окуня отмечено резкое увеличение активности α -амилазы начиная с этапа G (размерная группа 20–30 мм), в то время как у судака увеличение активности α -амилазы носит более плавный характер (рис. 2).

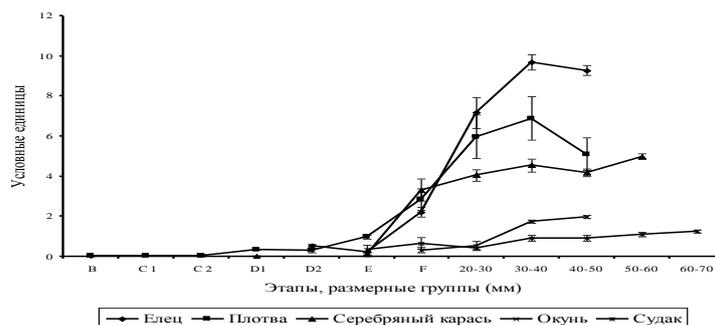


Рис. 2. Активность α -амилазы в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз.Чаны.

Изменения активности неспецифических липаз у ельца и плотвы на разных этапах онтогенеза сходны с таковыми других групп ферментов. Однако у серебряного карася изменение активности носит более сложный характер, выражающийся в высокой активности неспецифических липаз на этапах C2 и D1 (рис. 3). У судака при переходе с этапа E на F активность неспецифической липазы имеет тенденцию к увеличению. На этапе G (размерная группа 20–30 мм) активность липазы достоверно снижается и к размерной группе 30–40 мм стабилизируется. На этапах F и G у окуня активность липазы достоверно не отличается. В размерных группах 30–40 мм и 40–50 мм наблюдается ее достоверное снижение (рис. 3).

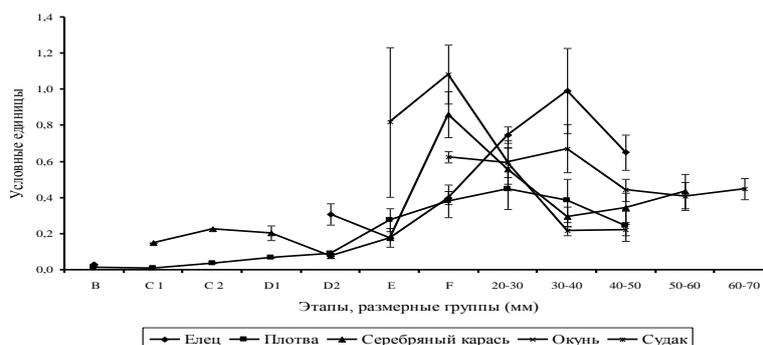


Рис. 3. Активность липазы в кишечнике мирных рыб на разных этапах онтогенеза в оз.Чаны.

Наличие широкого спектра кишечных гидролаз на начальных этапах развития характерно для многих видов рыб (Кузьмина, 2005). Различия в активности групп пищеварительных гидролаз одного вида и у разных видов рыб позволяют оценить степень “важности” той или иной группы пищеварительных ферментов на разных стадиях онтогенеза. У ельца и плотвы на этапе развития B обнаружен весь спектр исследуемых пищеварительных гидролаз кишечника. Наибольшей активностью в этот период обладают неспецифические эстеразы и α -амилаза по сравнению со щелочными протеазами. У серебряного карася на ранних этапах развития нами не обнаружено активности α -амилазы. Это согласуется с данными, полученными для пикши *Melanogrammus aeglefinus* (Kim et al., 2001). Для серебряного карася на этапе развития C1 и C2 наибольший вклад в гидролиз пищевых компонентов вносят щелочные протеазы и неспецифические эстеразы. Известно, что у только что выклюнувшихся личинок зубана *Dentex dentex* активность трипсина и химотрипсина выше, чем активность амилазы и липазы, что объясняется “важностью” этих ферментов в онтогенезе (расщепление белков желточного мешка) (Gisbert et al., 2009). Подобная видоспецифичность активности пищеварительных гидролаз характерна для всех костистых рыб и, видимо, отражает их адаптации на уровне ферментов уже на самых ранних этапах развития.

По нашим данным у исследованных видов рыб при переходе с этапа E на этап F наблюдается резкое увеличение специфической активности всех исследуемых групп ферментов. Подобное явление свойственно многим видам рыб и может характеризовать становление пищеварительной функции желудочно-кишечного тракта. Отмеченное нами в

некоторых случаях уменьшение специфической активности может быть связано со снижением синтеза мРНК, кодирующей этот фермент и с изменением рациона и биохимического состава объектов питания в течение сезона (Cahu, Zambonino Infante, 1994). Известно, что в течение первых 3 недель жизни чрезвычайно высокую активность проявляют цитозольные пептидазы, принимающие участие во внутриклеточном пищеварении белков, тогда как ферменты гепатопанкреаса и щеточной каймы еще слабо функционируют (Zambonino Infante, Cahu, 2001). Таким образом, наблюдаемое нами резкое увеличение специфической активности исследуемых групп ферментов при переходе с этапа Е на этап F можно объяснить становлением модели пищеварения характерной для взрослых особей.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что активность основных групп ферментов, принимающих участие в пищеварении рыб, обнаруживается уже на ранних этапах онтогенеза. У конкретных видов рыб активность тех или иных групп ферментов проявляется на разных этапах развития, что может быть связано с составом потребляемой пищи и свидетельствует о степени важности различных гидролаз на каждом из этапов. Разделение рыб на мирных и хищных по уровням активности пищеварительных гидролаз происходит на этапе поздней личинки. Активность всех исследованных пищеварительных гидролаз в это время повышается, однако уровни активности зависят от типа питания рыб. На ранних этапах онтогенеза для мирных рыб (плотва, елец, серебряный карась) характерна более высокая активность α -амилазы по сравнению со щелочными протеазами. Для хищных рыб (окунь, судак) отмечена обратная зависимость.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Уголев, А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций: Элементы современного функционализма. Л.: Наука. 1985. 544 с.
2. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)/ F.J. Alarcón, T.F. Martínez, P. Barranco et al.//*Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2002. V. 32. P. 265–274.
3. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream/ S. Deguara, K. Jauncey, C. Agius//*Journal of Fish Biology*. 2003. V. 62. P. 1033–1043.
4. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding / A. Gawlicka, B. Parent, M. H. Horn et al.//*Aquaculture*. 2000. V. 184. P. 303–314.
5. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//*Analytical Biochemistry*. 1976. V. 72. P. 248–254.
6. Кузьмина, В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука, 2005. 300 с.
7. Kim, B.G. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*) / B. G. Kim, S. Divakaran, L. B. Christopher, A. C. Ostrowski//*Fish Physiology and Biochemistry*. 2001. V. 24. P. 225–241.
8. Cahu, C.L., Zambonino Infante J. L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes//*Comp. Biochem. Physiol.* 1994. V. 109 A. №. 2. P. 213–222.
9. Zambonino Infante, J.L., Cahu C.L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae//*Comparative Biochemistry and Physiology*. 2001. V. 130. Part C. P. 477–487.

ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES OF FISH (CHANY LAKE) ON EARLY STAGES OF ONTOGENESIS

Solovyev Mikhail, Kashinskaya Eleena, Izvekova Galina

In this work we have studied ontogenetic development of main digestive enzymes (total alkaline protease, nonspecific lipase and α -amylase) of 5 species of freshwater fishes. Three species of fishes (dace, crucian carp and roach) were euryphagous and another two species (perch and pikeperch) were carnivorous. Between stages (E, F) and G we have observed rapidly increment of activity of studied enzymes. We detected that all investigated species of fishes had similar patterns of development of digestive enzymes.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВЛИЯНИЯ ФИЛЬТРАТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ РЕЛИКТОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИНФУЗОРИЙ (*PARAMESCIUM CAUDATUM*)

Субботин А.М.¹, Гнатченко Л.Н.², Петухова Г.А.²,
¹ Учреждение Российской Академии Наук Тюм НЦ СО РАН,
г.Тюмень, ул.Малыгина,86
²ФГБОУ ВПО Тюменский Государственный Университет,
г.Тюмень, ул.Пирогова 3
e-mail: luyba05.86@gmail.com

При воздействии антропогенных и естественных геологических процессов на многолетне - мерзлые породы в экосистемы вносятся микроорганизмы, не характерные для данной геологической эпохи и сложившихся современных микробиот, что приводит к появлению в экосистемах новых микробных компонентов. Их влияние на современные организмы практически не изучено [1,2]. Исследование взаимоотношения между организмами разных уровней организации в данном аспекте может представлять большой интерес [3].

Бактерии культивировали на среде ГРМ при двух температурах +36°C и +4°C. Смывы бактерий со среды производили дистиллированной водой в объеме 5 мл. Плотность бактериальной взвеси 10⁹ мкл/мл. Взвеси микробных клеток в дистиллированной воде инкубировали в термостате при выше указанных температурах в течение 5 дней, после чего производили фильтрацию через бактериальный фильтр «Millipore» с размером пор 0.22 мкм. Фильтраты добавляли в питательную среду инфузорий в дозах 5 мкл., 10 мкл., 20 мкл., 30 мкл. Изучали следующие показатели: плотность культуры инфузорий, поведенческие реакции инфузорий - двигательную активность и хемотаксис. Плотность культуры учитывали на 3, 5, 7 и 9 день наблюдения, поведенческие реакции на 3-й и 9-й день [4].

В исследовании использовали бактериальный штамм: *Listeria sp.*, *Pseudomonas putida*, выделенные из кернов скважины, пробуренной в районе Тарко-Сале (Западная Сибирь) идентифицированный по 16S ribosomal RNA gene. Первичный сравнительный анализ полученных de novo последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проведён с помощью программы Blast [5]. Редактирование последовательностей, выявление открытой рамки считывания и компьютерное транслирование проводили с помощью программы BioEdit.

Во все сроки эксперимента при добавлении фильтрата *Listeria sp.* во всех используемых дозах, полученных при температурах +36°C и +4°C, наблюдалось статистически достоверное снижение плотности культуры инфузорий по сравнению с контролем (табл.1). При действии фильтрата, полученного при температуре +36°C на 9 сутки эксперимента отмечается снижение (P<0,05) двигательной активности и хемотаксиса инфузорий при действии доз в 5 мкл, 10 мкл и 20 мкл (табл. 1). При действии фильтрата, полученного при температуре +4°C на 9 сутки отмечается снижение (P<0,05) двигательной активности и хемотаксиса (табл. 1).

Доза фильтрата 30 мкл по сравнению с меньшими дозами имеет тенденцию менее активно подавлять физиологические показатели инфузорий. По влиянию на двигательную активность данной дозы наблюдаются статистически достоверные различия по сравнению с низкими дозами фильтрата при обеих температурах культивирования бактерий. По влиянию на хемотаксис полученные значения показателя при воздействии дозы в 30 мкл. статистически достоверно выше, чем при воздействии дозы в 5 мкл при обеих температурах культивирования бактерий.

Воздействие на физиологические показатели инфузорий фильтратов, полученных при разной температуре культивирования бактерий, не имеет выраженных различий, т.е. температурный фактор культивирования данного микроорганизма, вероятно, не оказывает существенного влияния на свойства и количество экзометаболитов, которые находятся в фильтрате.

Таблица 1. Физиологические параметры инфузорий на 9 сутки эксперимента при воздействии фильтрата бактериальной культуры, полученной при разных температурах культивирования

| Вариант эксперимента | Доза мкл | Фильтраты, полученные при +36°C | | | Фильтраты, полученные при +4°C | | |
|------------------------------------|----------|---------------------------------|------------------|------------|--------------------------------|------------------|------------|
| | | Плотность | Двиг. активность | Хемотаксис | Плотность | Двиг. активность | Хемотаксис |
| Контроль | | 43.84±1.23 | 18.67±0.34 | 10.5±0.27 | 43.84±1.23 | 18.67±0.34 | 10.5±0.27 |
| Фильтрат <i>Listeria sp.</i> | 5 | 22.00±1.1* | 7.00±0.0* | 7.93±0.1* | 20.60±0.6* | 6.07±0.1* | 6.93±0.1* |
| | 10 | 23.67±0.8* | 4.40±0.4* | 9.20±0.3* | 18.07±2.4* | 3.67±0.6* | 5.13±0.7* |
| | 20 | 23.27±0.9* | 5.33±0.3* | 8.33±0.6* | 21.20±1.1* | 4.80±0.2* | 7.73±0.2* |
| | 30 | 24.20±0.5* | 10.00±0.0* | 10.00±0.0 | 23.40±0.6* | 10.67±0.5* | 8.00±0.0* |
| Контроль | | 44.34±1.32 | 16.17±0.56 | 8.0±0.3 | 44.34±1.32 | 16.17±0.56 | 8.0±0.3 |
| Фильтрат <i>Pseudomonas putida</i> | 5 | 20.60±0.9* | 5.73±0.1* | 3.87±0.3* | 25.47±0.2* | 5.13±0.1* | 7.60±0.1* |
| | 10 | 22.93±0.5* | 6.73±0.1* | 5.20±0.1* | 23.80±0.5* | 8.40±0.5* | 6.20±0.1* |
| | 20 | 20.53±0.8* | 6.53±0.2* | 5.27±0.1* | 24.00±0.5* | 8.40±0.3* | 5.60±0.2* |
| | 30 | 22.13±0.3* | 8.87±0.1* | 3.67±0.1* | 24.53±0.3* | 7.40±0.4* | 6.20±0.1* |

Примечание: * - статистически достоверные различия ($P < 0,05$) с контролем

В исследовании использовали бактериальный штамм: *Pseudomonas putida* штамм 3/09, выделенный из керна скважины, пробуренной в районе Тарко-Сале (Западная Сибирь) идентифицированный по 16S ribosomal RNA gene. Первичный сравнительный анализ полученных de novo последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проведён с помощью программы Blast [5]. Редактирование последовательностей, выявление открытой рамки считывания и компьютерное транслирование проводили с помощью программы BioEdit.

Во все сроки эксперимента при добавлении фильтрата бактерий полученного при температурах культивирования +36°C и +4°C со всеми исследуемыми дозами наблюдалось статистически достоверное снижение плотности культуры инфузорий, двигательной активности и хемотаксиса по сравнению с контролем (табл.1).

При использовании экзометаболитов *Pseudomonas putida*, полученных при температурах +36°C и +4°C наблюдается достоверное снижение плотности культуры инфузорий по сравнению с контролем практически в 2 раза. При сравнении фильтратов, полученных при температурах +36°C и +4°C между собой показатель плотности культуры инфузорий немного выше при использовании фильтрата, полученного при температуре +4°C, достоверные различия ($P < 0,05$) наблюдаются при использовании доз 5 мкл и 20 мкл (табл.1).

При изучении двигательной активности инфузорий видно, что при действии фильтрата, приготовленного при температуре +36°C в дозе 30 мкл двигательная активность достоверно выше ($P < 0,05$) чем при использовании меньших доз фильтрата. При сравнении двигательной активности инфузорий при действии фильтратов, приготовленных при температурах +36°C и +4°C не наблюдается достоверных различий при использовании дозы в 5 мкл. При добавлении фильтрата полученного при температуре +4°C в более высоких дозах (10 мкл и 20 мкл) наблюдается достоверное различие анализируемого показателя ($P < 0,05$) который выше двигательной активности инфузорий при действии фильтрата, полученного при температуре +36°C. При действии дозы в 30 мкл фильтрата, полученного при температуре +4°C двигательная активность инфузорий достоверно ниже, чем при добавлении фильтрата, полученного при температуре +36°C (табл.1).

При изучении хемотаксиса инфузорий видно, что действие доз фильтратов в 5 мкл и 30 мкл, полученных при температуре +36°C достоверно ниже, чем доз фильтрата в 10 мкл и 20 мкл. Показатель хемотаксиса инфузорий при действии дозы фильтрата в 5 мкл, полученного при температуре +4°C достоверно выше, чем при использовании других доз, действие которых достоверно не различается между собой. При сравнении показателя хемотаксиса инфузорий, при добавлении фильтратов полученных при разных температурах культивирования микроорганизмов наблюдается достоверно более высокое значение показателя при добавлении фильтрата, полученного при температуре +4°C (табл.1). Из полученных результатов следует, что экзометаболиты *Pseudomonas putida* штамма 3/09 выделенного из керна скважины, пробуренной в районе Тарко-Сале, оказывают угнетающее действие на физиологические параметры *Paramecium caudatum*, при этом может иметь некоторое значение температура культивирования бактерий и дозозависимый эффект.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Brushkov A.V., Katayama T., Fukuda M., Moriizumi J., Nakamura T., Asano K., Tanaka M., Beget J, Tomita N. A late quaternary ice wedge from the Fox Permafrost Tunnel in central Alaska is a time capsule for gas and bacteria // SIM News. Magazine of the Society for Industrial Microbiology, 2006. Vol. 56, № 1. P. 10-16.
2. Гнатченко Л.Н., Петухова Г.А., Субботин А.М. Последствия воздействия реликтовых микроорганизмов и их внеклеточных метаболитов на инфузорий (*Paramecium caudatum*). //Материалы международной конференции «Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.И. Кожова». Иркутск, 2010. С. 399.
3. Brouchkov A.V., Melnikov V.P., Sukhovei Yu.G., et al. Relict microorganisms of criolitozone as possible objects of gerontology //Advances in gerontology, vol.1, №1, P.39-44.
4. Голубкова Э. Г. Проведение токсикологических экспериментов с использованием парамеций / Э. Г. Голубкова. Петрозаводск, 1990. 16с.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

ASSESSMENT OF SAFETY OF INFLUENCE OF FILTRATES OF BACTERIAL CULTURE OF RELIC MICROORGANISMS ON INFUSORIANS (PARAMECIUM CAUDATUM)

Subbotin A.M.¹, Gnatchenko L.N.², Petuhova G.A.²

¹Establishment of Russian Academy of Sciences Tum NTS of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science,

² Tyumen State University

Under the influence of anthropogenic and natural geological processes in the permafrost - permafrost microorganisms are introduced into the ecosystem, not characteristic of the geological era and established the modern microbiota, which leads to the appearance of new microbial ecosystem components. Their influence on modern organisms is practically not been studied [1,2]. Investigation of the relationship between organisms of different levels of organization in this aspect can be of great interest [3].

АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА РЫБ

Т.А Субботкина, М.Ф. Субботкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанова Российской академии наук,

Борок, Россия

E-mail: smif@ibiw.yaroslavl.ru

Иммунная система животных рассматривается как система контроля, обеспечивающая индивидуальность и целостность организма. В процессе адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды и при защите от инфекций важную роль играют неспецифические механизмы системы резистентности. Они являются основой иммунной защиты беспозвоночных и низших позвоночных, в том числе рыб. Рыбы, на долю которых приходится 40% видов позвоночных, представляют собой наиболее древнюю и многочисленную группу позвоночных. Постоянство их обитания в водной среде, на протяжении длительного

эволюционного периода, связано с успешным функционированием иммунной системы. Иммунная система рыб обладает такими особенностями, которые эффективно поддерживают адаптации к различным средам: от глубоких морей до рек или озер всех климатических зон, включая сухой и влажный сезоны (Tort et al., 2003).

Естественный иммунитет или система неспецифической резистентности состоит из нескольких основных компонентов, включая лизоцим. Синтез всех компонентов генетически детерминирован (Йегер, 1990). Они являются важными параметрами, которые часто используются в качестве индикаторов реакций рыб на изменения водной среды. Интерес к изучению адаптивных возможностей рыб постоянен в связи с не прекращающимся антропогенным воздействием на естественные водоемы и возрастающими масштабами аквакультуры во всем мире.

Лизоцим – фермент группы гликозидаз (НФ 3.2.1.17) считается одним из наиболее изученных факторов врожденного иммунитета рыб (Tort et al., 2003). В качестве основной функции лизоцима рассматривается бактерицидность или антибактериальная способность (Йегер, 1990). Однако, роль лизоцима этим не ограничивается, он участвует в ряде других иммунных реакций (Субботкина, Субботкин, 2003; Saurabh, Sahoo, 2008). Кроме того, лизоцим рыб вовлечен в общую реакцию тревоги, действуя в качестве белка острой фазы, и рассматривается как очень чувствительный показатель (Tort et al., 2003). Изучение лизоцима ведется уже несколько десятилетий, за это время обследованы многочисленные виды рыб (Лукьяненко, 1989; Субботкина, Субботкин, 2003; Saurabh, Sahoo, 2008).

Нами исследованы 48 видов рыб, относящиеся к 12 отрядам, населяющие р. Волгу, Каспийское, Белое, Охотское и Южно-китайское моря, и аквакультура Центрального Вьетнама. В сообщении представлены: русский осетр *Acipenser gueldenstaedti*, севрюга *Acipenser stellatus*, белуга *Huso huso* (Acipenseriformes), белорыбица *Stenodus leucichthys*, корюшка *Osmerus mordax dentex* (Salmoniformes), щука *Esox lucius* (Esociformes), лещ *Abramis brama*, густера *Blicca bjoerkna*, жерех *Aspius aspius*, карась Кювье *Carassius cuvieri*, язь *Leuciscus idus*, кутум *Rutilus frisii*, плотва *Rutilus rutilus*, красноперка *Scardinius erythrophthalmus*, линь *Tinca tinca*, карп обыкновенный *Cyprinus carpio*, белый амур *Ctenopharyngodon idella*, пестрый толстолобик *Hypophthalmichthys molitrix* (Cypriniformes), сом *Siluris glanis* (Siluriformes), навага *Eleginus gracilis*, треска атлантическая *Gadus morhua*, треска тихоокеанская *Gadus macrocephalus*, минтай *Theragra chalcogramma*, налим *Lota lota* (Gadiformes), окунь речной *Perca fluviatilis*, судак *Sander lucioperca*, берш *Sander volgense*, гигантский морской окунь *Lates calcarifer*, коричнево-пятнистый групер *Epinephelus chlorostigma*, багровый окунь *Lutjanus erythropterus*, гигантский гурами *Osphronemus goramy*, нильская тилapia *Oreochromis niloticus* (Perciformes), получешейник *Hemilepidotus gilberti*, морской голубой окунь *Sebastes glaucus* (Scorpaeniformes), белокорый палтус *Hippoglossus stenolepis*, камбала звездчатая *Platichthys stellatus*, (Pleuronectiformes). Содержание лизоцима определяли методом диффузии в агар в печени, почках, селезенке и сыворотке крови (Субботкина, Субботкин, 2003).

Исследованиями показано разнообразное распределение фермента в организме рыб и широкий диапазон варьирования его количества у разных видов (рис. 1).

Многолетние наблюдения свидетельствуют как о значительных колебаниях, так и сходных значениях лизоцима при межгодовых сравнениях одних видов (Субботкина, Субботкин, 2003). К факторам, влияющим на активность лизоцима у рыб относят экологию, стресс, инфекции, сезон, пол и стадии половой зрелости, температуру воды, соленость среды, уровень pH, седиментацию, водные токсиканты, иммуностимуляторы и пробиотики (Saurabh, Sahoo, 2008). Вместе с тем показано, что действие одного и того же фактора, на различные виды рыб может приводить к противоположным результатам (Bols et al, 2001). К сожалению, в большинстве работ содержание лизоцима анализируется только в сыворотке/плазме крови (Bols et al, 2001). Несомненно, что для объективной оценки состояния рыб необходимы знания о концентрации этого фермента в разных органах и тканях.

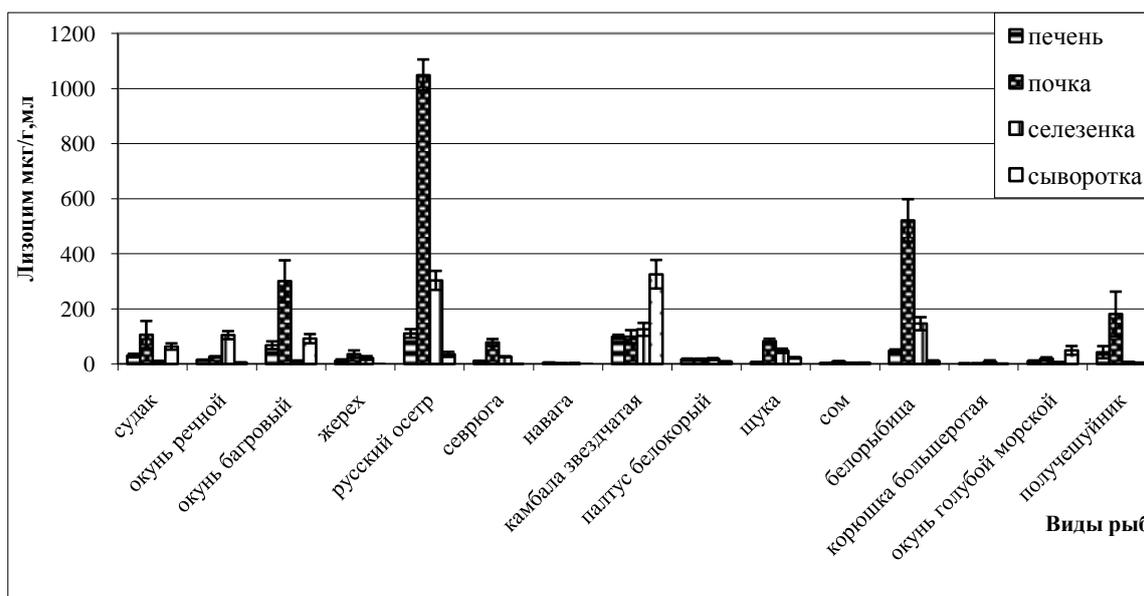


Рис. 1. Распределение лизоцима в органах и тканях различных видов рыб.

Исследование сезонных изменений лизоцима в сыворотке русского осетра и белуги показали разнонаправленные вариации в течение года (рис. 2). В сыворотке крови максимальная активность лизоцима наблюдалась летом, при более высокой температуре воды, и минимальная - в зимний период, при низкой температуре. Динамика колебаний лизоцима в сыворотке отличается от таковой в органах. В почках, селезенке и печени наиболее высокие концентрации фермента выявлены в зимние и весенние месяцы, а наиболее низкие – в конце лета – осенью.

Анализ количества лизоцима у щуки в течение весны, лета и осени, также выявил разнонаправленные колебания фермента. Отмечена тенденция нарастания количества лизоцима в печени, селезенке и сыворотке крови с повышением температуры воды и последующим снижением показателей осенью. Однако, в почках уровень фермента оставался стабильно максимально высоким, в сравнении с другими органами, на протяжении всего периода наблюдений (Извекова и др., 2010).

Температура является одним из важных абиотических факторов среды и его действие на иммунные реакции рыб, активно изучается. Показано повышение уровня лизоцима в сыворотке палтуса *Hippoglossus hippoglossus* и синего тунца *Thunnus thynnus* при повышении температуры воды (Langston et al., 2002; Watts et al., 2002). Такой эффект наблюдался у нильской тилляпии *Oreochromis niloticus*, при повышении температуры до 28°C, но при повышении до 33°C, содержание лизоцима начинало снижаться (Dominguez et al., 2005). Kumari et al. (2006) также зарегистрировали снижение уровня лизоцима у азиатского сома *Clarias batrachus* при 32,5°C. Следовательно, повышение температуры может приводить как к повышению уровня лизоцима в сыворотке крови, так и к понижению.

В естественных условиях обитания при сезонных изменениях температуры наблюдаются изменения лизоцимной активности в сыворотке/плазме крови рыб. У камбалы *Limanda limanda*, самые низкие уровни фермента отмечены в феврале-марте, в холодной воде, а самые высокие - в сентябре-октябре, при самой высокой годовой температуре (Hutchinson, and Manning, 1996). Анализ индийского большого карпа *Labeo rohita* показал более высокий уровень лизоцима в теплые сезоны, но пониженный - в зимний сезон (Swain, et al., 2007). Аналогичные изменения фермента наблюдались у атлантического палтуса *H. hippoglossus*, однако авторы не связывают сезонные колебания лизоцимной активности с температурой (Bowden, et al. 2004).

Сезонные колебания уровня лизоцима в организме рыб не могут рассматриваться только в зависимости от изменений температуры воды. Вариабельность лизоцима в печени и почках у щуки связана со зрелостью гонад, которая зависит не только от температуры (Субботкин, Субботкина, 2011).

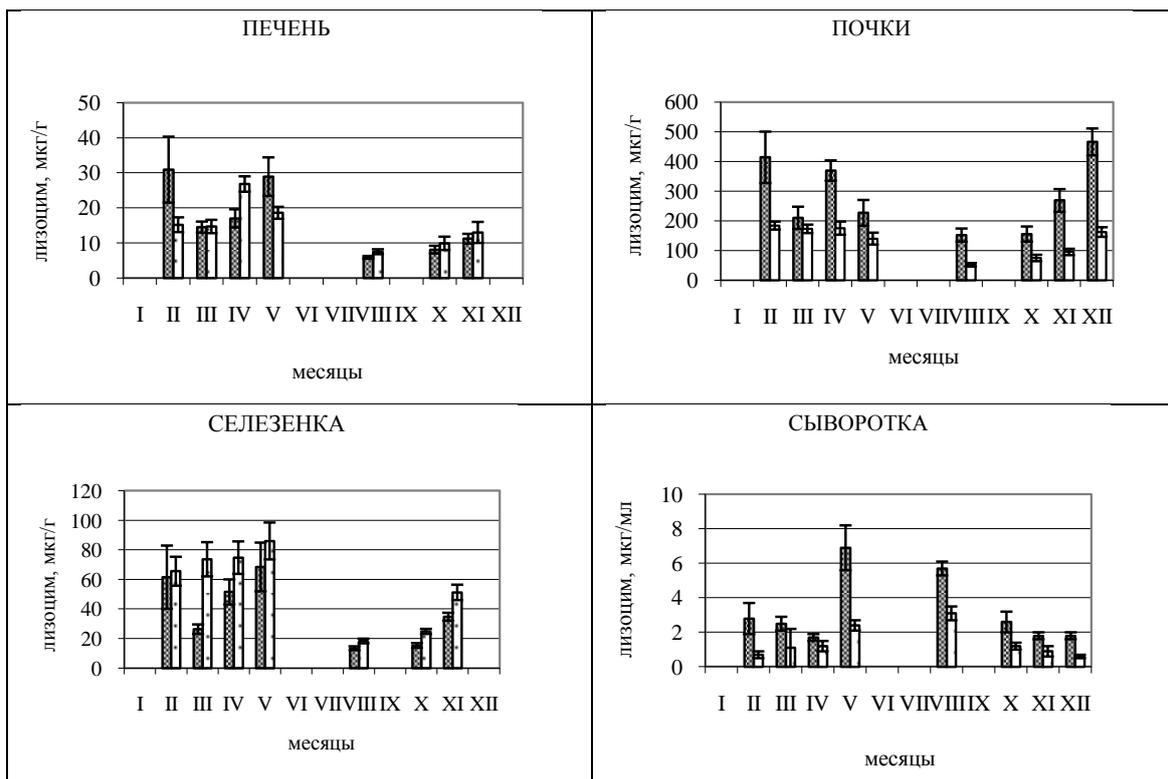


Рис. 2. Сезонные колебания лизоцима у русского осетра (■) и белуги (▨) в приплотинной зоне Волжской ГЭС в 1989 году.

Соленость – критический фактор водной среды, определяющий экологию многих видов рыб. При перемещении рыб из пресной воды в соленую обычно наблюдается повышение уровня лизоцима в крови. Вместе с тем, активность лизоцима плазмы не изменялась у мозамбикской тилапии после перевода рыбы из пресной воды в морскую воду (Saurabh, Sahoo, 2008). Действие гормона роста приводило к увеличению активности лизоцима у радужной форели в пресной воде, но не имело продолжения такого эффекта при перемещении рыб в морскую воду (Yada, et al., 2001). В другом исследовании радужной форели рост лизоцима в крови сопровождался снижением его количества в кожной слизи (Taylor, et al., 2007). У палтуса *Scophthalmus maximus* максимальная активность фермента в плазме крови наблюдалась в солености 20%, но была минимальной при 40%, независимо от продолжительности опыта (Zhang, et al., 2011). Следовательно, реакции неспецифического иммунитета рыб на воздействие солености не однозначны.

Интерес к изучению лизоцима как компонента врожденного иммунитета рыб связан также с наличием видов, характеризующихся очень низким содержанием этого фермента и видов, которые не содержат его в исследуемых тканях (Субботкина, Субботкин, 2003). Синтез компонентов неспецифической резистентности генетически обусловлен (Йегер, 1990), и такое проявление свойств лизоцима является специфической особенностью этих рыб. Соответственно, генетически близкие виды должны проявлять сходные иммунные реакции на воздействие факторов внешней среды. Парадокс в том, что морские виды трескообразных (отр. Gadiformes): атлантическая и тихоокеанская трески, навага и минтай, для которых характерен самый низкий уровень лизоцима в тканях органов и сыворотке крови в ряду обследованных рыб, не отличаются от своего пресноводного родственника налима. Это показывает, что соленость, как фактор внешней среды постоянного места обитания, не влияет на уровень лизоцима у родственных видов рыб. Другая группа рыб, которая характеризуется низкими, а у некоторых видов очень низкими концентрациями лизоцима в органах, и часто отсутствием лизоцимной активности в сыворотке крови - это карпообразные (отр. Cypriniformes). Карп, пестрый толстолобик и белый амур, культивируемые в тропическом Центральном Вьетнаме, в условиях высоких температур, показали более низкий уровень лизоцима в органах, чем другие виды карповых рыб, обитающие в Европейской части России (рис. 3).

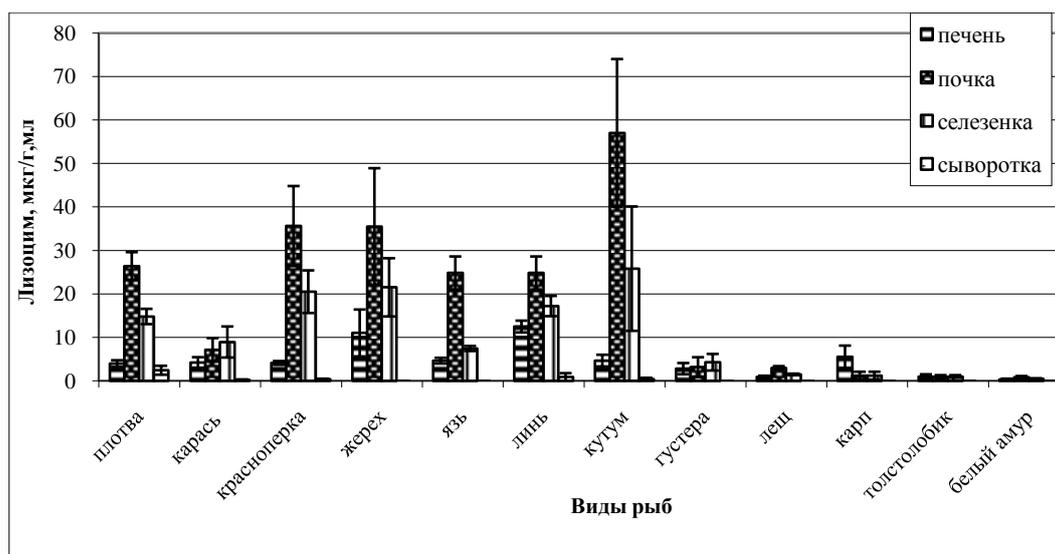


Рис. 3. Содержание лизоцима у карпообразных рыб из различных климатических зон.

Такие значения фермента у рыб из тропиков выявлены в жаркий период, когда в сыворотке индийского карпа, *L. rohita*, наблюдались более высокие концентрации лизоцима в сравнении с холодным зимним периодом (Swain и др., 2007). Представители многочисленного и широко распространенного отр. Perciformes - окунеобразные, выращиваемые в теплых тропических водах: гигантский морской окунь, коричнево-пятнистый групер, гурами и нильская тилапия, не выделяются на фоне европейских видов: судака, берша и речного окуня повышенным содержанием лизоцима в организме (рис. 4). Только у багрового окуня в почках обнаружен высокий уровень фермента, в 3 раза и более превышающий показатель других видов, в том числе тропических.

Сравнительный анализ родственных групп рыб, из разных климатических зон, на примере карпообразных и окунеобразных показал, что повышенный температурный режим, как фактор среды обитания, не обуславливает более высокий уровень лизоцима в органах и тканях местных рыб. Следует также отметить, что гигантский морской окунь, багровый окунь и коричнево-пятнистый групер относятся к морским рыбам, а остальные к пресноводным.

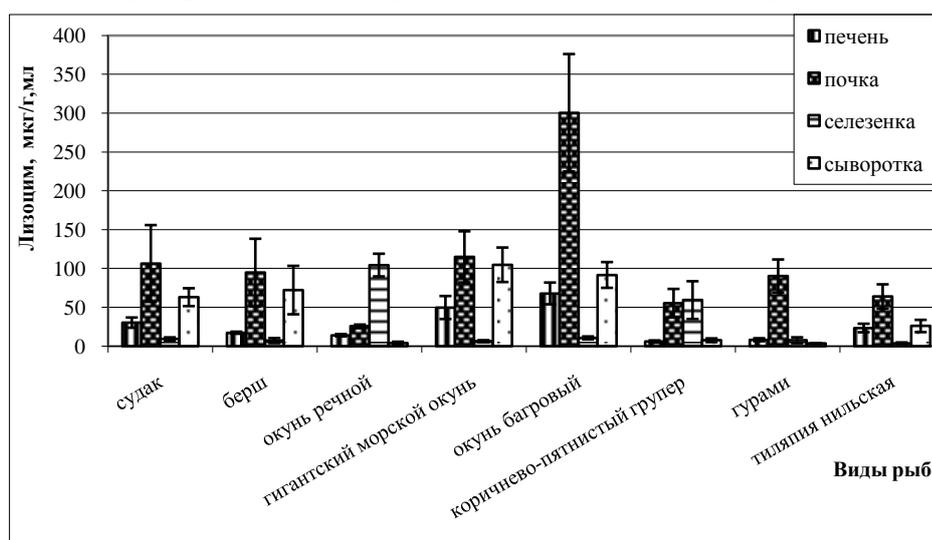


Рис. 4. Содержание лизоцима у окунеобразных рыб из различных климатических зон.

Представленные материалы показывают, что иммунная система рыб позволяет успешно адаптироваться к разнообразным условиям обитания, сохраняя генетически контролируемый уровень лизоцима. Вероятно, в естественной среде обитания высокие значения лизоцима у одних видов рыб не обеспечивают им адаптивных преимуществ перед другими видами, с

низкими значениями этого параметра. Колебания показателей неспецифической защиты вызывают не сами естественные факторы внешней среды, как таковые, а их изменения. Иммуномодулирующее действие внешних факторов в эксперименте, изменяющее показатели врожденного иммунитета, может иметь эффект, ограниченный по силе и времени.

Авторы благодарят коллег из Приморского отделения Российско-Вьетнамского тропического центра (Нячанг, СРВ) за помощь при сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Извекова Г.И., Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в организме щуки при заражении цестодами // Биол. внутр. вод. 2010. № 2. С.73-76.
2. Изменчивость иммунокомпетентных органов и содержания лизоцима при созревании гонад у щуки *Esox lucius* L. Рыбинского водохранилища / Субботкин М.Ф., Субботкина Т.А. // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Матер. III Международ. конф. 2011. М. С.-70-74.
3. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. М.: Медицина, Т. 1. 1990. 527 с.
4. Лукьяненко В.И. Иммунобиология рыб. Врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат, 1989. 271 с.
5. Субботкина Т.А., Субботкин М.Ф. Содержание лизоцима в органах и сыворотке крови у различных видов рыб р. Волги // Журн. эволюционной биохимии и физиол. 2003. Т.39, № 5. С.430-437.
6. Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. Ecotoxicology and innate immunity in fish // Dev. Comp. Immunol. 2001. V.25.-P.853-837.
7. Bowden T.J., Butler R., Bricknell I.R. Seasonal variation of serum lysozyme levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) // Fish Shellfish Immunol. 2004. V.17, № 2. P.129-135.
8. Dominguez M., Takemura A., Tsuchiya M. Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. // Aquacult. Research. 2005. V.36. P.391-397.
9. Hutchinson T.H., Manning M.J. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U.K. // Fish Shellfish Immunol. 1996. V.6, № 7. P.473-482.
10. Kumari J., Sahoo P.K., Swain T., Sahoo S.K., Sahu A.K., Mohanty B.R. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus* // Aquacult. 2006. V.252. P.121- 127.
11. Langston A.L., Hoare R., Stefansson M., Fitzgerald R., Wergeland H., Mulcahy M. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) // Fish Shellfish Immunol. 2002. V.12, № 1. P.-61-76.
12. Saurabh S., Sahoo P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system // Aquaculture Research. 2008. V.39. P.223-239.
13. Swain P., Dash S., Sahoo P.K., Routray P., Sahoo S.K., Gupta S.D., Meher P.K., Sarangi N. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations // Fish Shellfish Immunol. 2007. V.22. P.38-43.
14. Taylor J.F., Needham M.P., North B.P., Morgan A., Thompson K., Migaud H. The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout // General Comp. Endocrinol. 2007. V.152, № 2-3. P.-314-325.
15. Tort L., Balasch J.C., Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses // Immunologia. 2003. V.22, № 3. P.277-286.
16. Watts M., Munday B.L., Burke C.M. Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnaud): implications for aquaculture // J. Fish Diseases. 2002. V.25. P.191-200.
17. Yada T., Azuma T., Takagi Y. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone // Comp. Biochem. Physiol. B: Biochemistry and Molecular Biology. 2001. V.129, № 2-3. P.695-701.
18. Zhang Y., Mai K., Ma H., Ai Q., Zhang W., Xu W. Rearing in intermediate salinity enhances immunity and disease-resistance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) // Acta Oceanol. Sin.-2011.-V.30, № 4.-P.122-128.

ADAPTIVE RESPONSE OF NONSPECIFIC IMMUNITY OF FISH

T.A. Subbotkina, M.F. Subbotkin

The differences between fishes in the content of lysozyme and its distribution in the liver, kidneys, spleen, and blood serum are shown. Seasonal variations of the enzyme in the organs and blood serum have a different direction and are not related to water temperature. A comparative analysis of relative species from different environments: salt or fresh waters, the tropics or the temperate latitudes indicates the similarity of fishes by the studied parameter. Perhaps, high values of lysozyme in some fish species do not provide adaptive advantages over other species which has low values of this parameter in their natural habitats. The system of nonspecific defense of fish makes it possible to adapt successfully in a wide range of habitats, without changing the level of lysozyme which is genetically controlled.

О СПЕЦИФИКЕ ВЛИЯНИЯ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ПЛОТВЫ (*RUTILUS RUTILUS L*)

Таликина М.Г., Крылов В.В.

*Институт биологии внутренних вод РАН им. И.Д. Папанина Борок, Россия,
E-mail: talykina@ibiw.yaroslavl.ru*

Настоящее сообщение является частью комплексного изучения влияния магнитных полей (МП), различных по частоте и величине индукции, при экспериментальном их воздействии на биологические системы гидробионтов (Крылов, 2008; Krylov, 2010;). Воспроизведенная в лабораторных условиях магнитная буря (МБ) в направлении лишь одной компоненты и переменное МП после действия на оплодотворенную икру плотвы (*Rutilus rutilus*) в период делений дробления, приводили к ряду отдаленных биологических эффектов (Крылов и др., 2010).

С учётом усовершенствованных возможностей более полного и точного воспроизведения МБ, были поставлены новые эксперименты, также на эмбрионах плотвы. Воздействие планировалось начать с момента оплодотворения, то есть до закладки структур будущего организма, что позволяло проанализировать ход митотического деления зародышевых клеток будущего организма и оценить эффект прямого воздействия на них внешнего фактора. Цель настоящей работы – выявить специфику влияния воспроизведенной экспериментально типичной МБ на процесс пролиферации бластоцитов плотвы.

Использовано две партии осемененной икры: первая – от двух пар производителей из Рыбинского водохранилища (2010 г.), вторая – от одной пары, выращенной в прудовых условиях (2011 г.).

Воспроизведение МБ проводилось в экспериментальной установке, позволяющей компенсировать в рабочем объёме флуктуации геомагнитного поля и создавать заданные пользователем сложные трёхкомпонентные магнитные поля.

В состав экспериментальной установки входит трёхкомпонентный феррозондовый магнитометр, регистрирующий локальное низкочастотное магнитное поле и его вариации (НВ0302А, НПО «ЭНТ», Санкт-Петербург), система из трёх пар взаимно ортогональных колец Гельмгольца, в которой происходит компенсация трёх компонент магнитного поля на основе регистрируемых сигналов и генерация заданных магнитных полей, оборудование для аналого-цифрового и цифро-аналогового преобразования сигналов (LTR-EU-8, ЗАО «Л-кард», Москва). Управление экспериментальной установкой осуществлялось при помощи компьютера со специальным программным обеспечением.

В экспериментах воспроизводились типичные МБ на основе трёхкомпонентного сигнала реальных МБ, случившихся в октябре-ноябре 2003 года и записанных ранее на широте проведения экспериментов. Бури были сходны между собой по продолжительности и амплитуде вариаций, но различались по общей картине. МБ, соответствующие картине сигнала, использованного в эксперименте 2011 г., встречаются чаще, чем бури, соответствующие картине сигнала использованного в эксперименте 2010 г.

Схема эксперимента включала экспонирование в течение 24 ч кристаллизаторов с развивающейся икрой в МБ от оплодотворения до стадии поздней бластулы. Контрольные варианты находились в условиях естественного магнитного поля.

По окончании экспозиции материал для цитоморфологии фиксировали в смеси этанола и ледяной уксусной кислот - 3:1. Смену воды проводили дважды в сутки. Температура инкубации первой партии икры колебалась в пределах 17.5 -19.0, второй - 14.5 - 17°C.

Цитогенетический анализ проводили на тотальных давленных препаратах, окрашенных ацетоорсеином. Учитывали общее число просматриваемых клеток, норму и видимые цитоморфологические отклонения по стадиям митоза - метафазы, анафазы и телофазы. Критериями нарушений были хромосомные и хроматидные мосты и полумосты, отставание хромосом при расхождении к полюсам и наличие их фрагментов в цитоплазме.

Для анализа каждой партии икры использовали по 15-20 зародышей, митотическую активность оценивали по общему числу делящихся клеток в %. Суммарную долю aberrантных анафаз и телофаз выражали в % от общего числа митозов в каждом из опытных вариантов.

Как следует из приведенных ниже данных, при выбранных режимах экспозиции в обеих партиях отмечено стимулирующее воздействие МБ на пролиферацию бластомеров. В проанализированных клетках опытных зародышей отмечено достоверное, по сравнению с контролем, увеличение числа отдельных стадий митоза и их общего числа в целом. Более низкие значения митотического индекса в 2010 г. обусловлены применением нестандартной для этих целей фиксирующей смеси, на саму же тенденцию - увеличение числа митозов при воздействии МБ, это обстоятельство не повлияло.

Таблица. Показатели митотического деления зародышевых клеток плотвы в контроле и после экспозиции магнитной бури

| Показатели | Партия икры 1 | | Партия икры 2 | |
|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | Контроль | Магнитная буря | Контроль | Магнитная буря |
| Все бластоциты | 25 525 | 17 440 | 19 150 | 16 340 |
| Все митозы | 330 | 389 | 869 | 909 |
| Митотический индекс, % | 12.6 ± 0.5 | 22.2 ± 1.8* | 45.8 ± 1.9 | 56.7 ± 2.4* |
| Стадии митоза, %: | | | | |
| метафаза_ норма | 6.3 ± 0.4 | 9.3 ± 1.2* | 18.3 ± 1.1 | 23.4 ± 1.1* |
| метафаза_ aberrации | 0.4 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 2.1 ± 0.4 | 2.4 ± 0.4 |
| анафаза + телофаза_ норма | 5.5 ± 0.5 | 11.1 ± 0.7* | 21.7 ± 1.1 | 27.9 ± 2.2* |
| анафаза + телофаза_ aberrации | 0.4 ± 0.2 | 1.1 ± 0.4 | 3.7 ± 0.5 | 2.9 ± 0.5 |
| Всего митозов, %: | | | | |
| нормальных | 11,8 ± 0.3 | 20.3 ± 1.7* | 40.0 ± 1.6 | 51.3 ± 2.3* |
| aberrантных | 0.8 ± 0.3 | 1.9 ± 0.5 | 5.8 ± 0.8 | 5.4 ± 0.8 |

Примечание. * - здесь и в табл. 2-3 различия достоверны при $p < 0.05$.

В обеих партиях развивающейся икры не выявлены достоверно значимые различия в частоте встречаемости хромосомных aberrаций между контрольным и опытным вариантами, хотя число клеток с патологией митоза после экспозиции МБ имеет тенденцию к увеличению.

Митоз – генетически детерминированный процесс, основная задача которого - равное распределение наследственного материала и субклеточных структур в две образующиеся дочерние клетки, нарушение его чревато несбалансированными хромосомными наборами, дестабилизацией генома и онтогенетическими нарушениями на разных структурных уровнях (Ильинских, 1992).

Выявленное увеличение митотической активности развивающихся зародышей плотвы демонстрирует чувствительность к испытанному физическому фактору каких-то определенных клеточных (или субклеточных) структур. Конкретизация их в рамках настоящей работы вряд ли возможна и мы можем лишь констатировать сам факт повышенной инициации непрямого деления клеток, обусловленной, скорее всего, воздействием МБ.

Переход клетки к митотическому делению и его успешная реализация осуществляется только по завершении синтеза ДНК и обеспечивается так называемым «фактором, стимулирующим митоз», который синтезируется в цитоплазме в конце интерфазы. В настоящее

время известна биохимическая структура входящих в него компонентов, включающая циклин, зависимую от циклина неактивную протеинкиназу и активный фактор стимуляции митоза (Ченцов, 2004).

Вполне возможно, что исследованные МБ в анализируемый тест-системе способствовали усилению белково-синтетической функции клеток плотвы. По мнению Бинги (2002) физические условия реализуемости биологических эффектов магнитных полей наиболее вероятны на молекулярном уровне.

При воздействии внешнего сигнала на метаболизм клетки, вне зависимости от его природы, большое значение также придается ионному гомеостазу клетки и особой роли в его обеспечении заряженных двухвалентных ионов. В частности, отмечают значительную роль полифункциональных ионов Ca^{++} , участвующих в работе многих ферментных систем, в реализации процессов оплодотворения, дробления и в сохранении структуры и функции клеточных мембран (Бродский, 2009).

Есть мнение, что магнитные поля разного происхождения и с разной частотой и величиной индукции, способствуют увеличению проницаемости поверхностной мембраны к ионам Ca^{++} и утечкой их в цитозоль. Этот эффект действует как метаболический стимулятор процессов роста и изменения сроков митоза (Goodman et al., 1993; Levin, Ernst, 1995). В магнитобиологии также поддерживается гипотеза о том, что первичной мишенью действия МП являются ионы-кофакторы различных белков (Леднев и др., 2003).

Таким образом, воздействие в течение суток низкочастотных флуктуаций магнитного поля в нанотесловом диапазоне, соответствующих магнитной буре, оказывает достоверное стимулирующее влияние на пролиферативную активность зародышевых клеток плотвы, не вызывая при этом достоверно значимого кластогенного эффекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бинги В.Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. М.: МИЛГА, 2002. 592 с.
2. Бродский В.Я. Клеточная теория. Развитие в исследованиях межклеточных взаимодействий // Онтогенез. 2009. Т. 40. №5. С. 323-333.
3. Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Наука, 1992. 272.
4. Крылов В.В. Действие слабых низкочастотных электромагнитных полей на морфо-биологические показатели гидробионтов (на примере *Daphnia magna* Straus и *Rutilus rutilus*). Борок. 2008. 24 с.
5. Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г., Зотов О.Д., Осипова Е.А. Действие типичной магнитной бури на ранний онтогенез плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биология внутр.вод 2010. № 4. С. 67-70.
6. Леднев В.В., Белова Н.А., Рождественская З.Е., Тирас Х.П. Биоэффекты слабых переменных полей и биологические предвестники землетрясений // Геофизические процессы и биосфера. 2003. Т. 2. № 1. с. 1-9.
7. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М. : Академкнига, 2004. 495 с.
8. Goodman R., Chizmadzhev Yu., Shirley-Henderson A. Electromagnetic Fields and Cells // J. of Cell. Biochemistry. 1993. V. 51. P. 436-441.
9. Krulov V.V. Effects of electromagnetic fields on parthenogenic eggs of *Daphnia magna* Straus // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2010. V. 73. Issue 1. P. 62-66.
10. Levvin M., Ernst S.G. Applied AC and DC magnetic field cause alterations in the mitotic cycle of early sea urchin embryos // Bioelectromagnetics. 1995. V. 16. P. 231-240.

ON THE SPECIFIC EFFECTS TYPICAL MAGNETIC STORMS ON THE GERM CELLS ROACH (*RUTILUS RUTILUS* L)

M.G. Talikina, V.V. Krylov
Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok, Russia

The impact within a day of low-frequency fluctuations of the magnetic field in the range nanotesla (magnetic storm) has a stimulating effect on the proliferative activity of germ cells of roach and does not cause a significant clastogenic effect. Discusses the mechanisms of action of non-thermal effects of physical factors at the cellular level.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕННОСТИ НА ПОПУЛЯЦИЮ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* (BLOCH, 1782)

Д.В. Усламин, О.А. Алешина

ФГБ ОУ ВПО Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

e-mail: uslamin.d.w@gmail.com

В последние годы в научной литературе все шире обсуждается вопрос о грядущих климатических перестройках, обусловленных т.н. «парниковым эффектом» антропогенного происхождения, изменение температуры при этом происходит медленно, с небольшим нарастанием (это теоретически влечет за собой увеличение испарения и как следствие – увеличение солености воды). Поэтому изучение влияния разной солености воды на сообщества представляет в настоящее время дополнительный интерес как прототип возможных изменений в биоценозах под влиянием возможного потепления (Филатов и др., 2003). Влияние солености и основных ионов воды на метаболические процессы гидробионтов и формирование видового состава сообществ отобрано во многих исследованиях (Хлебович, 1974).

Работы по изучению влияния солености воды на гидробионтов в Западной Сибири на территории Новосибирской области активно проводятся в последние годы (Ермолаева, 2005). На территории Тюменской области проводимые исследования связаны в основном с рыбохозяйственным освоением озер и носят характер отчетов. Проведенный анализ доступных публикаций по изучению адаптивного ответа водных сообществ в озерах юга Тюменской области на изменение общей солености и ионного состава воды на популяционно-динамическом уровне немногочисленны, что указывает на необходимость исследований в этом направлении.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы являлось изучение влияния различной минерализации на популяцию и биохимические показатели *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) озер юга Тюменской области.

Аборигенным и промысловым видом озер юга Тюменской области является серебряный карась - *Carassius auratus*. Согласно поставленной цели, были выбраны типичные карасевые озера: Малиновое, Большое, Бузан, Глубокое, Щербаково. Материал собирали в весенне-осенний период 2010г. в полевых условиях. Сбор и обработку материала для морфометрического анализа проводили по общепринятым в ихтиологии методикам (Правдин, 1966). Все промеры и просчеты сделаны на свежих экземплярах из разно-размерных групп рыб. Объем собранного материала составил 975 экземпляров. Одновременно со сбором ихтиологического материала отбирали воду на гидрохимический анализ. Для определения концентрации белка и липидов мышечной ткани с каждого озера были отобраны экземпляры рыбы и с каждого экземпляра взяты 2 пробы мышечной ткани. Определение концентраций белка проводился по методу фотоколориметрии (метод Лоури) (Уильямс, 1978). Липиды определяли экстрагированием навески исследуемых тканей в аппарате Сокслета (Уильямс, 1978).

Сравнив возрастную структуру карася серебряного из озер с разной минерализацией, можно отметить определенную тенденцию: с изменением минерализации воды меняется и соотношение возрастов. С увеличением солености начинают доминировать в популяции старшие возраста, что связано с адаптивными способностями организма. Соотношение в популяции особей разного возраста меняется в зависимости от состояния среды.

Половая структура популяций характеризуется соотношением в них особей разного пола. В диапазоне солености 1,8-5,6 г/дм³ процентное соотношение самцов и самок существенно не отличалось и в уловах составляло в основном 1:6. Доля самок в популяциях достигала 85-87%. В диапазоне солености 7,7-12,0 г/дм³ соотношение полов составляет 1:3. Доля самок снижается до 75-72%, что указывает на менее благоприятные условия обитания особей. Соотношение полов в первую очередь зависит от наследственных свойств вида, но в значительной мере контролируется и внешними условиями. Соотношение полов может служить показателем состояния популяций, поскольку по мере ухудшения условий жизни количество самцов в них увеличивается, а по мере улучшения условий жизни - наоборот.

В зависимости от экологических условий карась обыкновенный достигает половой зрелости обычно в возрасте 3—4 лет, а при очень благоприятных условиях — в возрасте 2 лет. Самцы становятся половозрелыми несколько раньше самок. В озерах Малиновое, Большое и Бузан карась достигает половой зрелости у самцов в 2 года, а у самок в 3 года. В озерах

Глубокое и Щербаково оба пола становятся половозрелыми в 4х летнем возрасте. Таким образом, анализ материала по соотношению полов и по достижению половой зрелости показывает, что озера с соленостью 1,8; 2,6; 5,6 г/л воды обладают более благоприятными экологическими условиями для карася, чем озера с соленостью 7,7 и 12,0 г/дм³ воды.

Полученные данные по росту карася были соотнесены с соленостью воды. В диапазоне солености от 5,6 и 7,7 г/дм³ во всех возрастах снижается прирост и привес, кроме 2/2+ леток, показатели у которых наоборот возрастают. После точки с соленостью 7,7 г/дм³ начинают возрастать прирост и привес во всех возрастах. Зависимость прироста карася от величины солености воды имеет колебательный характер с понижением в диапазоне солености 5-8 ‰, что подтверждается работами Хлебович, 1974. Полученные данные указывают на довольно резкие изменения в интенсивности и направленности обменных процессов в этом узком диапазоне.

Чтобы доказать, что снижение прироста не связано с питанием, был рассчитан индекс наполнения кишечника (ИНК, ‰), который характеризует интенсивность питания. С увеличением солености повышается интенсивность питания. В диапазоне критической солености интенсивность питания не снижается, а продолжает повышаться.

Функциональное состояние рыб отражается на содержании белка и липидов в их тканях. Проведенный биохимический анализ показал, что в исследуемых озерах содержание белка в мышцах карася весной варьировало от 8,0 до 22,0 г/100г, летом – от 10,0 до 23,0 г/100г, осенью – от 11,0 до 23,0 г/100г. Полученные данные согласуются с результатами Кузьминой, 2008, по которым содержание белка в мышцах разных видов рыб колеблется от 6,2 до 23,0 г/100г. Сопоставив данные по солености и концентрации белка в мышцах карася по разным возрастам в весенне-осенний период, выявили, что с увеличением солености воды происходит увеличение концентрации белка в мышечной ткани. Минимальна концентрация отмечена при солености 1,8 г/дм³, а максимальная – при солености 12,0г/дм³. Эти данные подтверждаются корреляционным анализом (зависимость прямая $r = 0,95$).

Липиды играют важную роль в жизни рыб, так как они выступают в качестве структурных компонентов клеточных мембран и предшественника других компонентов клетки. В мышечном энергетическом обмене у рыб основную роль источника энергии выполняют липиды. Биохимический анализ показал, что в исследуемых озерах содержание липидов весной варьировало от 2,0 до 11,5 г/100г, летом – от 2,5 до 11,7 г/100г, осенью – от 3,0 до 11,0 г/100г. Полученные данные так же согласуются с работами Кузьминой В.В., по которым содержание липидов в мышцах разных видов рыб колеблется от 1,2 до 15,0 г/100г. Сопоставив данные по солености и концентрации липидов в мышцах карася по разным возрастам, выявили, что с увеличением солености воды происходит снижение концентрации липидов в мышечной ткани. Максимальная концентрация – при солености 1,8 г/дм³, а минимальная – при солености 12,0г/дм³. Эти данные подтверждаются корреляционным анализом (зависимость обратная $r = -0,95$).

В связи с изучением большого числа показателей, взаимосвязи между ними чрезвычайно сложные. Для подтверждения вышеизложенных данных, оценки варьирования исследованных показателей и определения основных факторов, влияющих на них проведен многомерный факторный анализ на основе программы STATISTICA (Statsoft,USA). Проанализировано 18 параметров. Результаты факторного анализа представлены в таблице 1.

Основное варьирование исследованных показателей определяется 1 и 2 факторами. Как видно из таблицы, первый фактор определяет 63,7% общей дисперсии; второй фактор -18,2%; третий фактор -6,4%; четвертый фактор – 6,8%. Остальные факторы не выделяют дисперсию эквивалентную дисперсии одной переменной. Таким образом, первому и второму факторам соответствуют большие значения коэффициентов корреляции, чем остальным факторам. Эти факторы определяют 82% варьирования исследованных показателей.

Наиболее значимым является первый фактор. Он описывает сильную зависимость индекса наполняемости кишечника, содержания в мышечной ткани белка и липидов как в двухлетнем, так и в пятилетнем возрасте, долю самок и самцов, соотношение полов в популяции (уровень связи выше 0,9). Первый фактор в существенной степени описывает минерализацию и содержание в водоемах Mg, Cl и SO₄ (уровень связи выше 0,8). В этой группе признаков более слабую связь (0,7) имеют Ca и pH.

Таблица 1. Результаты факторного анализа *C. auratus* (n=1000, P=0.95)

| Показатели | Фактор 1 | Фактор 2 | Фактор 3 | Фактор 4 |
|------------------------|--------------|--------------|----------|-------------|
| Концентрация белка | 0.92 | -0.04 | 0.24 | -0.20 |
| Концентрация липидов | 0.95 | 0.05 | 0.13 | -0.08 |
| Доля самок | 0.92 | -0.24 | -0.11 | -0.16 |
| Доля самцов | -0.92 | 0.24 | 0.11 | 0.16 |
| Прирост | -0.29 | -0.82 | -0.20 | -0.38 |
| Привес | -0.36 | -0.75 | -0.31 | -0.38 |
| Соотношение полов | -0.94 | 0.07 | 0.11 | 0.21 |
| ИНК | 0.94 | -0.21 | 0.08 | -0.03 |
| Общая минерализация | 0.89 | 0.07 | 0.14 | 0.08 |
| Mg | 0.87 | -0.39 | 0.16 | 0.03 |
| Ca | 0.71 | 0.46 | 0.45 | 0.11 |
| Fe | 0.37 | -0.75 | -0.47 | 0.13 |
| Cl | 0.88 | -0.37 | 0.14 | 0.06 |
| K | -0.11 | -0.18 | -0.21 | 0.92 |
| Na | 0.19 | 0.95 | -0.05 | 0.07 |
| SO ₄ | 0.86 | 0.26 | -0.35 | 0.01 |
| pH | 0.72 | 0.26 | 0.55 | -0.20 |
| Жесткость | 0.90 | -0.33 | 0.11 | 0.04 |
| Собственные значения | 13.38 | 3.82 | 1.36 | 1.42 |
| % объяснимой дисперсии | 63.76 | 18.20 | 6.48 | 6.80 |

Дисперсия второго фактора в основном тесно связана с концентрацией катионов Fe, Na и показателями развития рыб: приростом и привесом. Наиболее сильные связи в этой группе признаков определены для Na (0,95). Сила связи с другими характеристиками невысокая.

Дисперсия третьего фактора слабо связана с популяционными и биохимическими показателями карася. Содержание катионов K в 4 факторе описывается совершенно независимой координатой, которая определяет некоторую часть варьирования показателей развития карася и существенного влияния на него не оказывает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филатов Н.Н., Назарова Л.Е. и др. Оценка возможных изменений климата в бассейне крупнейших озер Европы Ладожского и Онежского. Влияние потепления климата на экосистемы больших озер Северо-Запада России (Ладога и Онега) // СПб. Препринт.- 2003.-С.6-22.
2. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов.- Л.: Наука,1974.-236с.
3. Ермолаева Н.И. К познанию фауны коловраток озер Новосибирской области. Коловратки (таксономия, биология и экология)// Материалы IV Междун. конф. Борок. ИБВВ РАН.- 2005.- С.53-68.
4. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб.- М.: Пищ. пром.,1966.-374с.
5. Уильямс Б. Методы практической биохимии.- М.: Мир,1978.-273с.
6. Кузьмина В.В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. - Борок: ООО «Принтхаус»,2008.-276с.

SALINITY EFFECTS ON POPULATION AND BIOCHEMICAL INDICATORS CARASSIUS AURATUS GIBELIO (BLOCH, 1782)

D. Uslamin, O. Aleshina
Tyumen State University, Tyumen, Russia
E-mail: uslamin.d.w @ gmail.com

Were studied sexual, size-age structure and composition of feeding lump *Carassius auratus* of Sladkovskij district in sought of Tyumen region. Research dependence of concentration of protein from biotics and non-biotics factors of lakes with different mineralisation. Expose dependence of concentration of protein in a muscles of crucian from IFG and salinity of lakes.

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РАЗДЕЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИ И МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ПЕРИОД ЭМБРИОГЕНЕЗА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ У СЕГОЛЕТКОВ ПЛОТВЫ.

А.А. Филиппов, И.Л. Голованова, В.В. Крылов, Ю.Г. Изюмов, Ю.В. Чеботарева.
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия *e-mail:*
andron@ibiw.yaroslavl.ru

В современных экологических условиях большинство рыбохозяйственных водоемов загрязнено тяжелыми металлами. Медь относится к необходимым микроэлементам и в то же время входит в список приоритетных загрязнителей природных вод (Перечень..., 1999). У ряда видов пресноводных костистых рыб в присутствии ионов меди *in vitro* в концентрации 0.1–25 мг/л показано снижение активности пищеварительных гидролаз, замедляющее скорость начальных этапов ассимиляции пищи (Кузьмина и др., 2005; Голованова, 2010). Различные антропогенные факторы физической и химической природы не только снижают скорость гидролиза углеводов (Голованова и др., 2006), но и могут изменять чувствительность пищеварительных гликозидаз рыб к действию тяжелых металлов *in vitro*.

Так, магнитное поле (МП) Земли, а также МП, создаваемые воздушными и подводными линиями электропередач, подводными трубопроводами, оборудованными системой катодной защиты, могут оказывать различные эффекты на гидробионтов, и изменять действие присутствующих в водной среде тяжелых металлов. В последнее время накоплено много данных о действии МП на темпы раннего развития, морфологические и биохимические показатели у различных биологических объектов, в том числе рыб (Skauli et al., 2000; Чеботарева и др., 2009; Крылов, 2010). Однако их влияние на пищеварительную функцию рыб изучено крайне слабо (Голованова и др., 2006). Поскольку у большинства видов рыб все стадии эмбриогенеза протекают во внешней среде и прямое действие различных факторов возможно уже на самых ранних этапах индивидуального развития, особое значение имеет оценка отдаленных последствий действия агентов в зародышевый период.

В связи с этим цель работы состояла в изучении отдаленных последствий раздельного и сочетанного действия агентов химической (ионы меди) и физической (магнитное поле) природы в период эмбриогенеза на эффективность гидролиза углеводов в кишечнике сеголетков плотвы *Rutilus rutilus* (L.).

Оплодотворенную сухим способом икру от 3 самцов и 4 самок плотвы, выловленных на нерестилище в Рыбинском водохранилище, заливали равными объемами речной воды или растворами $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 0.001 и 0.01 мг/л. В работе использовано шесть вариантов экспериментальных воздействий: контроль (чистая речная вода); раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с расчетной концентрацией ионов Cu^{2+} 0.001 мг/л; раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией ионов Cu^{2+} 0,01 мг/л; МП с частотой 72.5 Гц и величиной индукции 150 μT ; совместное действие МП и ионов Cu^{2+} в концентрации 0.001 мг/л; совместное действие МП и ионов Cu^{2+} в концентрации 0.01 мг/л. Значения ПДК меди для воды рыбохозяйственных водоемов составляет 0.001 мг/л (Перечень..., 1999). Концентрация SO_4^{2-} анионов в исследуемых растворах была нетоксичной (Перечень..., 1999). Обработку зародышей во всех вариантах производили в период от оплодотворения до гастрюляции. Смена воды и растворов проводилась дважды в сутки. После рассасывания желточного мешка по 400 личинок из контрольного и экспериментальных вариантов помещали в пруды с естественной кормовой базой (б/с «Сунога») на 4 мес. Смертность плотвы в прудах была минимальна и не зависела от применённого воздействия.

Активность гликозидаз (мальтаза, сахараза, амилолитическая активность) определяли в гомогенатах слизистой оболочки медиального отдела кишечника от 20 рыб для каждого из вариантов опыта. Гомогенаты и растворы субстратов готовили на растворе Рингера для холоднокровных животных (110 мМ NaCl, 1.9 мМ KCl, 13 мМ CaCl_2), pH 7.4. Амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал – α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20), а также активность сахаразы КФ 3.2.1.48 оценивали по приросту гексоз методом Нельсона в модификации Уголева и Иезуитовой (Уголев, Иезуитова, 1969). Активность ферментов в суммарных пробах гомогената определяли в пяти повторностях и выражали в

микромоль/г·мин). Кинетические характеристики гидролиза крахмала и сахарозы – значения кажущейся константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V) определяли графическим методом Лайнуивера-Берк. Результаты обработаны статистически методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и последующей оценкой различий при помощи LSD-теста при $p = 0.05$.

Отдаленные последствия действия МП и ионов меди в период эмбриогенеза проявились в статистически значимом разнонаправленном изменении активности гликозидаз и размерно-весовых показателей подопытной молоди плотвы. При раздельном действии МП и ионов меди 0.01 мг/л отмечено достоверное повышение значений большинства морфометрических показателей (длина и масса тела, абсолютная и относительная длина и масса кишечника), в то время как совместное действие этих факторов вызывало снижение длины и массы исследованных рыб по сравнению с контрольными особями. В большинстве случаев ионы меди при совместном действии с МП нивелировали положительный эффект последнего.

Амилолитическая активность достоверно снижалась у подопытных рыб по сравнению с особями контрольной группы на 36 и 13 % лишь в вариантах эксперимента с концентрацией меди 0.01 мг/л и при совместном действии МП и меди в той же концентрации (Табл.). В тоже время при действии МП амилолитическая активность была на 15 % выше, чем в контроле. При раздельном действии факторов значения K_m достоверно не изменялись (V гидролиза крахмала на 25–32 % ниже контроля). Однако при совместном действии факторов наоборот, значения V не меняются, а значения K_m снижаются на 20–38 %, свидетельствуя об адаптивном увеличении сродства ферментов к субстрату.

Таблица. Физиолого-биохимические показатели контрольных и подопытных групп плотвы *Rutilus rutilus*

| Показатели | Контроль | CuSO ₄ 0.001 мг/л | CuSO ₄ 0.01 мг/л | МП | МП и CuSO ₄ 0.001 мг/л | МП и CuSO ₄ 0.01 мг/л |
|--|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Амилолитическая активность, мкмоль/г·мин | 45.6±2.04 ^a | 43.6±0.75 ^a | 29.4±0.81 ^б | 52.4±1.17 ^в | 46.4±1.47 ^a | 39.8±0.92 ^в |
| K_m гидролиза крахмала, г/л | 2.59±0.14 ^{а,б} | 2.90±0.10 ^б | 2.59±0.17 ^{а,б} | 2.40±0.11 ^{а,в} | 2.08±0.12 ^в | 1.62±0.19 ^г |
| V гидролиза крахмала, мкмоль/г·мин | 64.5±2.14 ^a | 44.1±1.49 ^б | 44.0±1.68 ^б | 48.4±1.83 ^б | 61.7±1.86 ^a | 60.2±2.88 ^a |
| Активность сахарозы, мкмоль/г·мин | 1.99±0.04 ^a | 1.67±0.09 ^б | 1.64±0.07 ^б | 1.64±0.03 ^б | 1.76±0.05 ^{б,в} | 1.92±0.09 ^{а,в} |
| K_m гидролиза сахарозы, ммоль/л | 3.74±0.08 ^{а,б} | 4.01±0.61 ^б | 4.06±0.39 ^б | 2.79±0.30 ^{а,в} | 2.11±0.33 ^в | 3.91±0.39 ^б |
| V гидролиза сахарозы, мкмоль/г·мин | 2.17±0.06 ^a | 1.76±0.09 ^б | 1.86±0.07 ^б | 1.79±0.06 ^б | 1.90±0.06 ^б | 2.16±0.09 ^a |

Примечание. Приведены среднее значение показателя и его ошибка ($M \pm m$); индексы указывают на статистически достоверные различия между показателями в строке (ANOVA, LSD-test), $p = 0.05$.

Активность сахарозы во всех вариантах опыта была на 11–17 % ниже по сравнению с контролем. Аналогичное снижение на 13–19 % отмечено и для V гидролиза сахарозы. Исключение составляет вариант совместного действия МП и ионов меди 0.01 мг/л. Значение K_m гидролиза сахарозы достоверно снижается на 44 % лишь в варианте с совместным действием МП и ионов меди 0.001 мг/л, свидетельствуя об адаптивном увеличении сродства ферментов к субстрату.

Полученные данные по изменению морфометрических характеристик хорошо согласуются с результатами проведенного ранее эксперимента по совместному влиянию переменного электромагнитного поля (500 Гц, 150 мТ) и хлорофоса ($1 \cdot 10^{-2}$ мг/л) в период раннего эмбриогенеза плотвы. Так, воздействие МП вызывает достоверное увеличение, а в сочетании с хлорофосом – достоверное снижение морфометрических показателей сеголетков

плотвы. При этом максимальное уменьшение фермент-субстратного сродства, а также амилолитической активности и активности сахаразы выявлены при комплексном действии МП и хлорофоса (Голованова и др., 2006). В нашем эксперименте при совместном действии МП и ионов меди на активность гликозидаз и кинетические характеристики гидролиза углеводов, отмечено сглаживание эффектов раздельного действия этих факторов.

Ранее было установлено, что ионы меди в концентрации 0.1–25 мг/л *in vitro* снижают активность гликозидаз в слизи оболочке кишечника 11 видов рыб, обитающих в бассейне Рыбинского водохранилища (Филиппов, Голованова, 2010). Величина максимального торможения варьирует от 15 до 46% контроля в зависимости от вида рыб. В работе, выполненной в идентичных методических условиях, показано, что ионы меди в концентрации 25 мг/л снижают активность протеиназ (трипсина и химотрипсина) в кишечнике тех же видов рыб на 20–89% контроля, однако низкие концентрации (0.1–1 мг/л) этих металлов могут увеличивать ферментативную активность (Кузьмина и др., 2005). Снижение амилолитической активности в присутствии ионов меди в том же диапазоне концентраций показано в кишечнике и в целом организме молоди рыб (Голованова, 2010). Поскольку медь способна накапливаться в различных органах и тканях рыб (Mazon, Fernandes, 1999) вполне возможно, что это является одной из причин отдаленного эффекта на активность пищеварительных ферментов при действии металла в эмбриональный период.

Таким образом, при исследовании отдаленных последствий раздельного и совместного действия ионов меди и низкочастотного МП установлены разнонаправленные изменения активности пищеварительных гликозидаз, кинетических характеристик гидролиза углеводов и размерно-весовых показателей подопытной молоди плотвы. Совместное действие изученных факторов в ряде случаев усиливало негативный эффект (при совместном действии МП и меди в концентрации 0.01 мг/л отмечено снижение длины и массы тела). В ряде случаев наблюдалось сглаживание эффектов раздельного действия факторов: если при раздельном действии МП и меди в концентрации 0.01 мг/л активность сахаразы снижалась на 11–17 % от контроля, то при совместном действии этих факторов она не изменялась. Кроме того, при совместном действии МП и ионов меди отмечено увеличение сродства ферментов к субстрату, свидетельствующее об адаптивных изменениях этого показателя при кратковременном действии изученных факторов в период эмбриогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голованова И.Л. Влияние биогенных металлов (Cu, Zn) на активность карбогидраз молоди рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 98–103.
2. Голованова И.Л., Изюмов Ю.Г., Чеботарева Ю. В., Таликина М.Г. Отдаленные последствия раздельного и сочетанного влияния хлорофоса и переменного электромагнитного поля в период эмбриогенеза на эффективность гидролиза углеводов у сеголетков плотвы // Токсикологический Вестник. 2006. № 5. С. 34–38.
3. Крылов В.В., Чеботарева Ю.В., Изюмов Ю.Г., Зотов О.Д., Осипова Е.А. Действие типичной магнитной бури на ранний онтогенез плотвы *Rutilus rutilus* (L.) // Биол. Внутр. вод. 2011. № 4. С. 67–70.
4. Кузьмина В.В., Шишин М.М., Корюкаева Н.В., Наумова М.А., Ботяжева О.А. Влияние цинка и меди на эффективность гидролиза белковых компонентов пищи у ряда видов пресноводных костистых рыб в условиях *in vitro* // Биология внутр. вод. 2005. № 4. С. 84–91.
5. Перечень рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. М.: ВНИРО. 1999. 304 с.
6. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека. Л.: Наука, 1969. 192 с.
7. Филиппов А.А., Голованова И.Л. Раздельное и совместное влияние меди и цинка *in vitro* на скорость гидролиза углеводов у пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. 2010. № 1. С. 104–109.
8. 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. № 3. С. 422–428.
9. Mazon A.F., Fernandes M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1999. V. 63. № 6. P. 797–804.

10. Skauli K.S., Reitan J.B., Walther B.T. Hatching in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to a 50 Hz magnetic field // *Bioelectromagnetics*. 2000. V. 21. № 5. P. 407–410.

REMOTE RESPONSE SEPARATE AND JOINT EFFECT OF COPPER AND MAGNETIC FIELD IN EMBRYOGENESIS ON EFFICACY OF HYDROLYSIS OF CARBOHYDRATES AT JUVENILE ROACH.

A.A. Philippov, I.L. Golovanova, V.V. Krylov, Yu. G. Izyumov, and Yu. V. Chebotareva

The prolonged effects of separate and joint action of copper and low-frequency magnetic field upon roach *Rutilus rutilus* early development have been studied. It was revealed that the treatment resulted in the different changes of digestive glycosidase activity, kinetic characteristics of carbohydrates hydrolysis and body length and weight. Joint effect of the factors in some cases enhanced negative effect (at joint effect of magnetic field and 0.01 mg/l copper is noted depression of length and body mass). In some cases was observed a deletion effects separate action of studied factors. The decrease in Km values of carbohydrate hydrolysis evidencing the increase in the enzyme to substrate affinity may be the attribut to adaptive reactions of roach at early developmental stages in response to joint effect of magnetic field and copper in embryogenesis.

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ У МОЛОДИ РЫБ С РАЗНОЙ ЭКОЛОГИЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫХ ОСЦИЛЛЯЦИЙ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

В.В.Халько, Н.А.Халько

Институт биологии внутренних вод им.И.Д.Папанина РАН, Борок, Россия

e-mail: khalko@ibiw.yaroslavl.ru

Адаптивные ответы метаболизма липидов в организме пойкилотермных позвоночных животных на воздействия колебаний природных факторов разной продолжительности до сих пор остаются слабо изученными. Наименее известны в хронобиологии гидробионтов суточные и сезонные колебания состава мембранных липидов, от динамики содержания и жирнокислотного состава отдельных классов которых во многом зависят функциональные свойства клеточных мембран при адаптации рыб к воздействию природных факторов разной периодичности (Крепс, 1981; Сидоров, 1983). Цель настоящей работы заключалась в обобщении собственных данных о характере суточных и сезонных изменений состава фосфолипидов в целом организме у сеголетков пресноводных видов рыб с разной экологией при естественной периодичности освещенности и температуры воды.

Для этого были использованы материалы суточных наблюдений, выполненных нами на сеголетках рыб, образующих нагульные скопления в литоральной зоне Рыбинского водохранилища - плотвы (*Rutilus rutilus* L.) и леща (*Abramis brama* L.) (июль и сентябрь 1998 г.), бычка-цуцика (*Proterorhinus marmoratus* L.) (июль, сентябрь 2007 г.), а так же на сеголетках двух видов рыб – окуня (*Perca fluviatilis* L.) и тюльки (*Clupeonella cultriventris* Nordmann) (июль, сентябрь 2003 г.), составляющих основу нагульных скоплений мальков в пелагиали этого водоема. По нашим данным, сеголетки плотвы, леща и бычка-цуцика питаются смешанной пищей (зоопланктоном и зообентосом), а окуня и тюльки – зоопланктоном. Отлов рыб в литорали осуществляли волокушей, в пелагиали - разноглубинным мальковым тралом. Все исследования выполнены на целых особях рыб, по 5-10 суммарных проб которых, включавших от 1 до 5 одноразмерных мальков в зависимости от их индивидуальной массы тела, отбирали на протяжении суток с интервалом в 4 ч. Навеска каждой суммарной пробы рыб составляла 0,8-1,0 г. Температуру воды измеряли в местах отлова рыб с точностью $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Для анализа сезонной динамики фосфолипидного состава молоди этих же видов рыб в годы исследований аналогичные суммарные пробы сеголетков отбирали ежемесячно с июля по октябрь в дневные часы суток (9-12 ч). Количественное определение общих липидов проводили по методу Фолча и соавт. (Folch et al., 1956) в модификации Лапина и Черновой (1970). Количество выделенных методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (90:10:1) суммарных фосфолипидов оценивали по методу Уолша (Walsh et al., 1965) в модификации Сидорова с соавторами (1972). Фракционирование фосфолипидов осуществляли в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (65:25:4). О количестве

индивидуальных фосфолипидов судили по концентрациям минерального фосфора, используя в качестве окислителя персульфат калия, а в качестве восстановителя – закрепленный сульфатом гидразина раствор хлорида олова (Халько, 1990). Всего было проанализировано 220 проб молоди плотвы, 130 проб – леща, 120 проб - окуня, 210 проб – тюльки и 210 проб – бычка-цуцика. На рисунках приведены значения средней арифметической проанализированных показателей и ее среднеквадратических отклонений.

Проведенные на сеголетках плотвы, леща, окуня, тюльки и бычка-цуцика исследования показали, что средняя масса тела и содержание общих липидов в нем у одноразмерных рыб на протяжении суток достоверно не изменяется ($p > 0,05$). Вместе с тем доля и количественный состав суммарных фосфолипидов в их организме подвержены существенным колебаниям, возникновению которых в значительной степени способствуют суточные осцилляции температуры воды, чередование дня и ночи и совместное влияние двух этих абиотических факторов. С помощью однофакторного дисперсионного анализа было установлено, что характер суточных колебаний уровня суммарных фосфолипидов у молоди рыб с разной экологией складывался в результате достоверных ($p < 0,05$) и разнонаправленных на протяжении суток содержания в основном трех составных компонентов – сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, вместе составлявшими свыше 90 % от общего количества фосфолипидов. Связь суточной динамики уровня трех этих мембранных липидов с суточным ходом температуры воды прослеживалась при различной продолжительности фотопериода. Выполненный на примере сеголетков плотвы двухфакторный дисперсионный анализ показал, что суточные осцилляции температуры воды сильнее влияют на вариации содержания сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина у рыб, чем фотопериодичность, задающая циркадность секреции многим влияющим на липидный обмен гормонам (Саутин, 1989). Часовая периодичность содержания сфингомиелина и фосфатидилхолина в организме сеголетков рыб противофазна аналогичным изменениям уровня фосфатидилэтаноламина при дневном прогревании и ночном охлаждении водной массы (рис. 1). Этот феномен может быть обусловлен разнонаправленностью изменений скорости биосинтеза трех упомянутых выше соединений в течение суток, контролируемой на стадии синтеза предшественников за счет зависимости химической структуры субстрата от температурных условий и субстратспецифичности энзимов метаболизма этих фосфолипидов (Anderson, 1970).

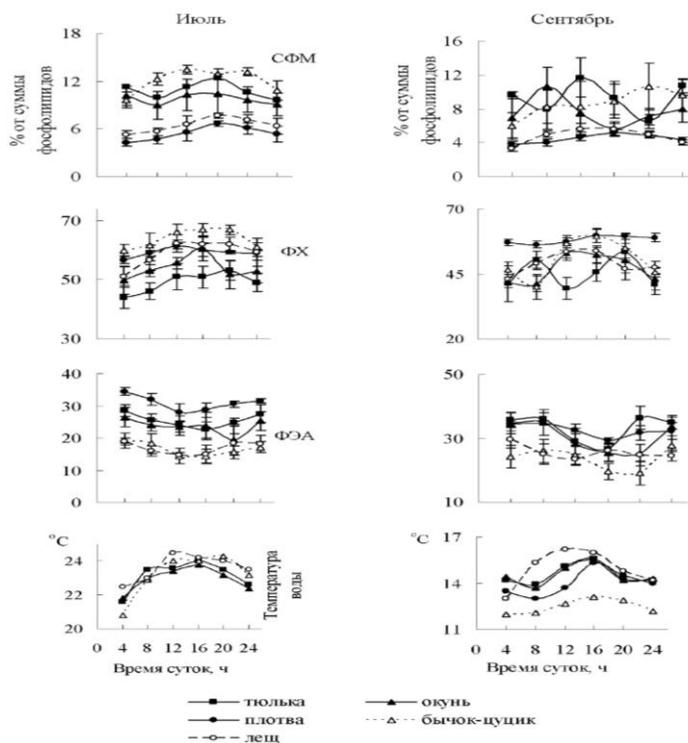


Рис. 1. Суточные вариации содержания сфингомиелина (СФМ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в организме сеголетков рыб с разной экологией и температуры воды в местах локализации их скоплений в Рыбинском водохранилище.

Выявленная нами динамика содержания сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина у молоди пяти видов рыб в течение суток оказалась сходной и близкой по характеру к термообусловленным изменениям соотношения трех этих фосфолипидов, регистрируемым в метаболически активных структурах организма у взрослых рыб при «холодовой» и «тепловой» акклимации (Крепс, 1981; Сидоров, 1983), а также в целом организме у молодых особей при продолжительных (сезонных) изменениях температуры воды в водоеме (рис. 2). По мере наступления устойчивых осенних похолоданий жирность сеголетков исследованных нами видов рыб возрастала, а содержание суммарных фосфолипидов в их организме - снижалось. При этом уровень фосфатидилэтаноламина у молоди рыб с разной экологией достоверно ($p < 0,05$) повышался, а уровень фосфатидилхолина и сфингомиелина – уменьшался (рис. 2).

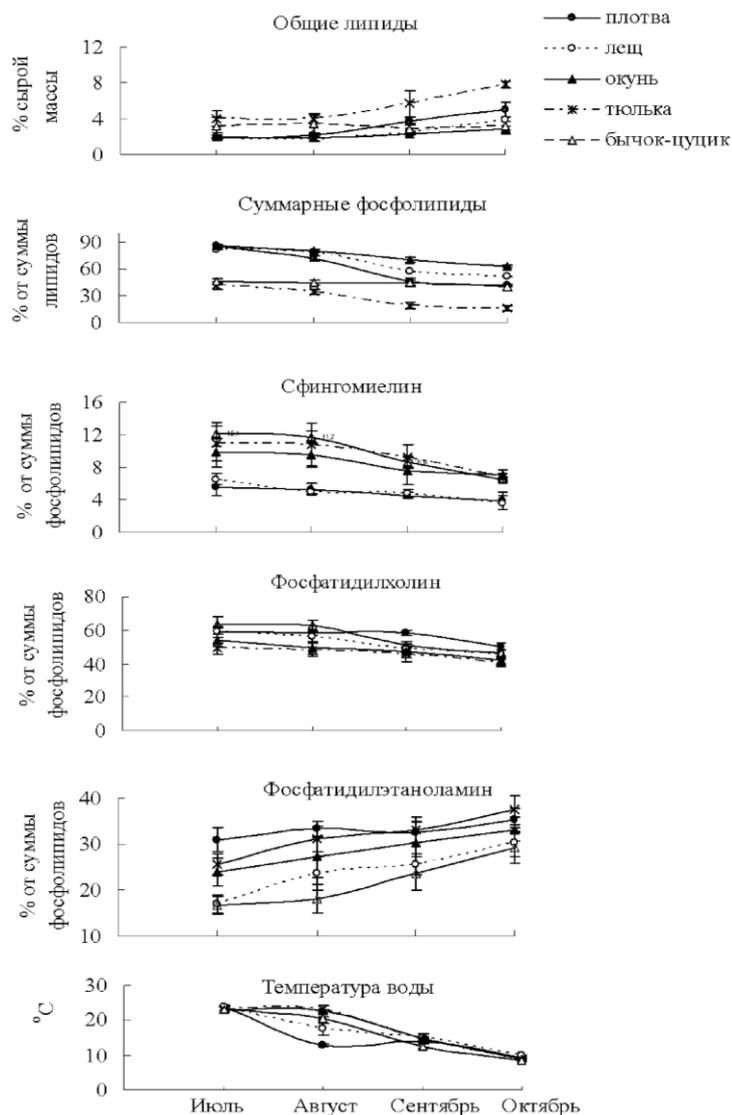


Рис. 2. Сезонные изменения содержания общих липидов, суммарных и основных классов фосфолипидов у сеголетков рыб с разной экологией и температуры воды в местах локализации нагульных скоплений последних в Рыбинском водохранилище.

Происходящее при понижении температуры воды увеличение содержания фосфатидилэтаноламина (самого ненасыщенного среди фосфолипидов соединения) у гидробионтов обычно расценивают в качестве такой же по биологической значимости адаптивной реакции организма, как и повышение степени ненасыщенности жирнокислотного состава фосфолипидов, в обоих случаях направленной на «подгонку» вязкости и проницаемости биомембран к низким температурам (Крепс, 1981). Такое сходство адаптивных

ответов фосфолипидного состава рыб на уровне целостного организма и его отдельных структур на температурные воздействия неодинаковой продолжительности свидетельствует о единстве лежащих в их основе механизмов регуляции термоадаптационных трансформаций фосфолипидов. Эти механизмы, очевидно, обеспечивают быстрые изменения физико-химических свойств биомембран как за счет перестройки жирнокислотных радикалов мембранных липидов, так и за счет изменения скорости биосинтеза фосфолипидов в целом у разных по экологии видов.

Проявлению суточных колебаний состава фосфолипидов у сеголетков рыб на организменном уровне могла способствовать повышенная степень общего метаболизма и чувствительности к воздействиям окружающей среды у молодых особей по сравнению со взрослыми рыбами. При различных по продолжительности осцилляциях природных условий ведущая роль в регуляции адаптационных изменений метаболизма мембранных липидов, по-видимому, принадлежит молекулярно-клеточным механизмам, что согласуется с существующими представлениями о вторичности эндокринного пути достижения организмом векторного гомеостаза (Саутин, 1989).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.:Наука, 1981. 339с.
2. Лапин В.И., Чернова Е.Г. О методике экстракции жира из сырых тканей рыб //Вопросы ихтиологии. 1970. Т. 10. Вып. 4. С.753-756.
3. Сидоров В.С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука, 1983. 240 с.
4. Сидоров В.С., Лизенко Е.И., Болгова О.М., Нефедова З.А. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тканевая специфичность липидов ряпушки *Coregonus albula* L. // Лососевые(Salmonidae) Карелии. Петрозаводск: Карел. филиал АН СССР, 1972. Вып. 1. С.150-161.
5. Саутин Ю.Ю. Проблема регуляции адаптационных изменений липогенеза, липолиза и транспорта липидов у рыб // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. Вып. 1. С.131-149.
6. Халько В.В. Количественное определение фосфолипидного состава тканей рыб с использованием персульфата калия // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1990. № 89. С. 68-72.
7. Anderson T.R. Temperature adaptation and the phospholipids of membranes in goldfish (*Carassius auratus*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. V. 33. № 3. P. 663-687.
8. Folch J., Lees M., Stonley A. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. № 1. P. 497-509.
9. Walsh D.E., Banasik O.I., Gilles K.A. Thin-layer chromatographic separation and colorimetric analysis of barley or malt lipid classes and their fatty acids // *J. Chromatog.* 1965. V. 17. № 2. P. 278-294.

ADAPTIVE CHANGES IN THE COMPOSITION OF MEMBRANE LIPIDS IN YOUNG FISHES OF DIFFERENT ECOLOGY SUBJECTED TO THE EFFECT OF SHORT-TERM AND LONG-TERM OSCILLATIONS OF ABIOTIC FACTORS

V.V.Khal'ko, N.A.Khal'ko
Institute for Biology of Inland Waters RAS, 152742 Borok, Russia

The data on daily and seasonal variations of the phospholipid composition in organisms of underyearlings of five fish species of different ecology are generalized. Hourly periodicity of the level of sphingomyelin and phosphatidylcholine in juveniles of all examined fish species is in antiphase to the similar changes in the level of phosphatidylethanolamino at natural changes in illumination intensity and water temperature. Similar adaptive reorganization of the composition of membrane lipids is observed in metabolically active organism structures in adult fishes under their acclimatization to low and high temperatures. The temperature-dependent character of changes in the composition of phospholipids in underyearlings is traced during the summer-autumn period. The role of molecular and cellular mechanisms and endocrine system in regulation of adaptive changes in the composition of phospholipids in young fishes at different duration of variations of environmental factors is discussed.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ *DAPHNIA MAGNA STRAUS* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПЛОТНОСТИ ПОСАДКИ НА ЕДИНИЦУ ОБЪЕМА СВОБОДНОГО ПРОСТРАНСТВА

А.А. Чемагин

Тобольская комплексная научная станция УрО РАН, г.Тобольск, Россия,

E-mail: chemagin@pochta.ru

Популяции планктонных ракообразных подвержены влиянию сезонных изменений, происходящих в водоеме. Следствием этого являются большие сезонные колебания их численности. Механизм формирования динамики численности многократно обсуждался в литературе, однако эта тема требует особого, более детализированного анализа, критического рассмотрения и обобщения накопленных сведений (Умнов, Алексеев, 1999). В данном опыте плотность культуры рассматривается как сигнальный фактор, благодаря которому реализуются физиологические адаптации дафний через изменение роста и репродукционного потенциала рачков. Исследование влияния плотности культуры, а также других факторов позволит наиболее полно познать механизмы динамики численности и выработать методы управления ею для целей рациональной эксплуатации биологических ресурсов.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ОПЫТА

Варианты опыта:

1-й вариант - 1 особь на 20 мл воды;

2-й вариант - 2 особи на 20 мл воды;

3-й вариант - 5 особей на 20 мл воды.

В данной серии опытов 1-суточных рачков, полученных от одной самки, помещали в пробирки объемом 20 мл с отстоянной аэрированной водой при различной плотности культуры. Дафний кормили водорослями *Scenedesmus quadricauda* 0,5 мл (в 1 мл 300 клеток водорослей) на 1 особь. Смену воды не производили, объем воды поддерживали постоянным. Длительность опыта определялась выживаемостью рачков. В течение всего опыта определяли длину тела рачков, плодовитость, продолжительность жизни, массу рачков, линейный и весовой прирост. Длину тела определяли при помощи окуляра-микрометра.

Расчет массы тела производился по формуле (Алимов, 1989):

$$W=qL^b, \text{ где}$$

$q=0,075$;

$b=2,925$;

L – линейный размер рачка, мм;

W – масса рачка, мг;

q и b – эмпирические константы;

Суточный прироста длины тела производился по формуле (Алимов, 1989):

$$L_t^1 - L_t^0 = \Delta L, \text{ где}$$

ΔL - прирост длины рачка, мм;

L_t^0 – длина рачка в первые сутки опыта, мм;

L_t^1 – длина рачка на следующие сутки опыта, мм;

Суточный прирост массы тела (Алимов, 1989; Иванова, 1985):

$$\Delta W = W_t^1 - W_t^0, \text{ где}$$

ΔW - прирост массы рачка, мг;

W_t^0 – масса рачка в первые сутки опыта, мг;

W_t^1 – масса рачка на следующие сутки опыта, мг;

Данные обрабатывались статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент показал, что продолжительность жизни рачков в лабораторных условиях у *D.magna* больше, чем в естественных и составляет 2-2,5 месяца. При этом продолжительность жизни при разной плотности посадки различна (Рис. 1).

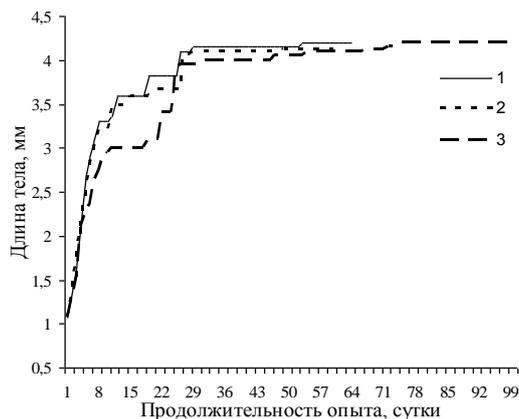


Рис. 1. Длина тела *Daphnia magna* Straus, содержащихся при различной плотности культуры, на протяжении опыта (1, 2, 3 – варианты опыта)

В I-м и во II-м вариантах опыта средняя продолжительность жизни дафний составила 45-50 дней, причем в этих вариантах по одному рачку дожили до возраста 64 и 60 суток соответственно; в III-м варианте опыта при максимальной плотности (5 экз./20 мл) средняя продолжительность жизни 60-70 дней, а два рачка дожили до возраста 80 и 100 дней соответственно. В природных же условиях средняя продолжительность жизни у дафний не превышает 20-30 суток. Высокую продолжительность жизни в данном опыте можно объяснить отсутствием хищников, постоянным наличием корма и постоянными условиями внешней среды.

Максимальный прирост массы тела дафний (Рис. 2) был отмечен в I-ом месяце их жизни.

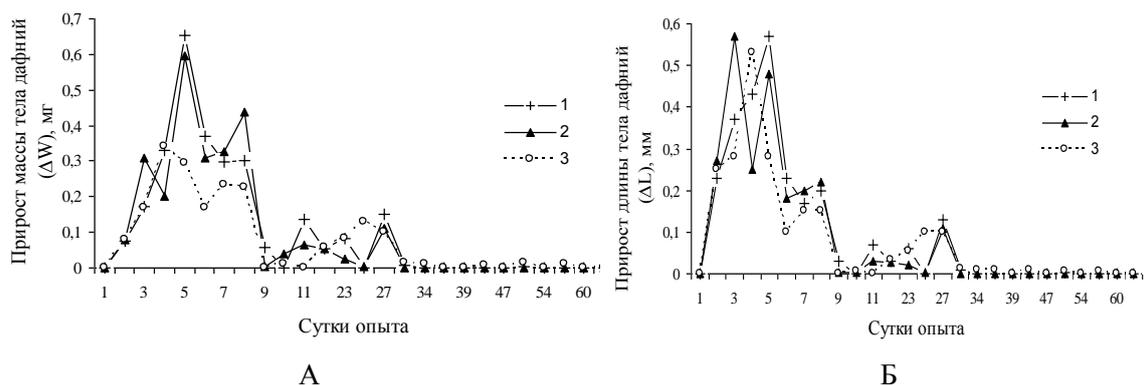


Рис. 2. Среднесуточный прирост (1, 2, 3 – варианты опыта) за период опыта: А-массы тела рачков; Б-длины тела рачков

Во всех 3-х вариантах опыта, наблюдалось 4 пика прироста. К 5-6-м суткам, пик был максимальным для рачков из 1-го варианта (по 1 экз); в 3-м варианте, с максимальной плотностью рачков (5 особей / 20 мл) прирост массы и длины был минимальным. На 7-9-е сутки максимум прироста отмечен во 2-м варианте, минимум в 3-м.

Следующие подъемы прироста массы и длины (Рис. 2) пришлось в I-м и II-м вариантах на 17-е и 29-е сутки, а в III-м на 23-е и 27-е сутки. Значения величин прироста у дафний можно объяснить большим пространством, приходящимся на 1 особь, более благоприятным кислородным режимом и рациональным расходом энергетических ресурсов. При наибольшем объеме свободного пространства, приходящегося, на одного рачка происходит максимальный рост, но при этом средняя продолжительность жизни сокращается с 70 до 50 суток.

В течение опыта наблюдалось 4 пика рождаемости, в каждом из которых максимум был отмечен в 1-ом варианте и составлял 13-18 шт. молоди, минимум в 3-м - 5,7-10,7 шт. и во 2-ом - 5,7-14 шт. (Рис. 3). Данное явление, вероятно, связано с реализацией репродукционного потенциала у ракообразных при определенном объеме свободного пространства, что хорошо прослеживается на рисунке 3.

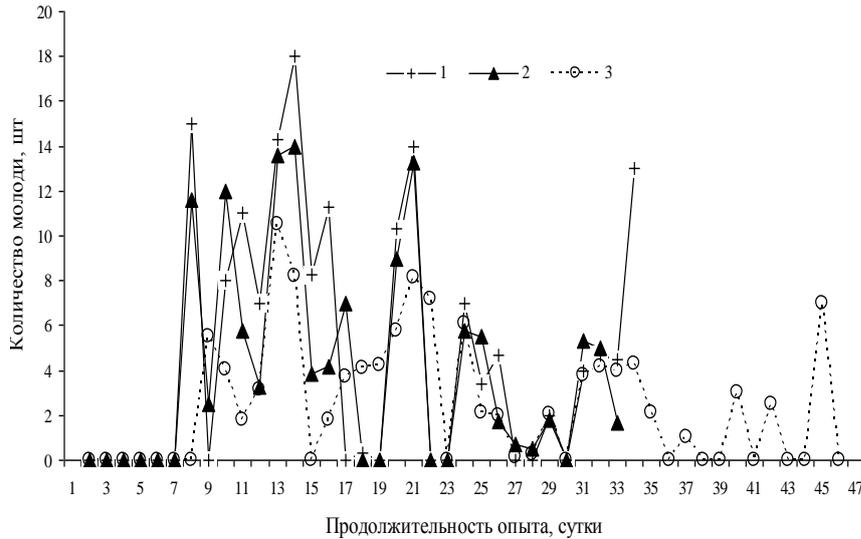


Рис. 3. Плодовитость дафний на протяжении опыта (1, 2, 3 – варианты опыта)

Плодовитость при разной плотности культуры была различной: максимальная средняя плодовитость за период опыта пришлась на 2-ой вариант и составила 116,7 шт. молоди/♀, минимальная при максимальной плотности (3-й вариант) - 87,6 шт.молоди/♀, в 1-м же варианте плодовитость составила 91 шт.молоди/♀ (Рис. 4).

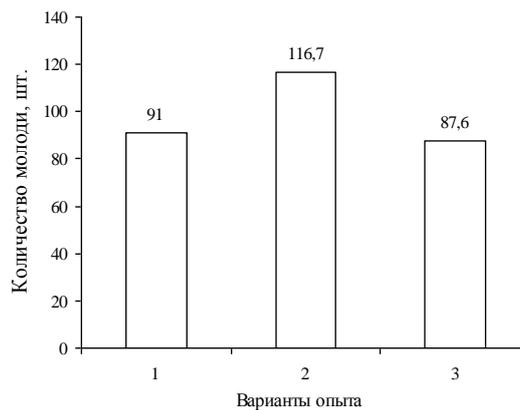


Рис. 4. Удельная плодовитость *Daphnia magna* Straus за период опыта

При повышенной плотности (5 рачков/20 мл) продолжительность жизни была на 33% выше, чем в других вариантах, но плодовитость - на 3-25% ниже, что, вероятно, связано с перераспределением энергетических ресурсов на выживание и на поддержание репродукционного потенциала на достаточно высоком уровне.

Известно (Константинов, 1976), что плодовитость рачков зависит от размеров их тела, на которые, в свою очередь влияет количество свободного пространства, приходящегося на 1 особь в данном опыте – при меньшей плотности рачков, плодовитость была больше, но максимальной плодовитость была у рачков средних размеров (2-ой вариант опыта).

На плодовитость рачков влияет их плотность (Евстигнеев, Соловьев, 1989). Высокое потребление кормовых объектов снижает обеспеченность пищей, что в свою очередь обуславливает и снижение плодовитости. Однако в этой серии опытов обеспеченность кормом для особей в каждом варианте опыта была одинаковой – 0,5 мл взвеси водорослей на 1 особь. Следовательно, можно сделать вывод, что на плодовитость рачков и скорость обменных процессов (рост) повлияло не обеспеченность кормом, а количество жизненного пространства. Причем наиболее оптимальным оказалось 10 мл воды для одного рачка (2-ой вариант опыта), где размеры рачков и их плодовитость были максимальными, по отношению к 1-му и 3-му вариантам опыта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов А.Ф. Введение в продукционную гидробиологию. Л.: Гидрометеиздат, 1989. 152 с.
2. Евстигнеев Е.С., Соловьев А.Н. Основы сырьевой базы гидробионтов. Л.: Наука, 1989. 157 с.
3. Иванова М.Б. Продукция планктонных ракообразных в пресных водах. Л.: Типография № 2 Ленуприздата, 1985. 223 с.
4. Константинов А.С. Волгоградское водохранилище (население, биопродуктивность и самоочищение). Саратов, 1976. С. 146-153.
5. Умнов А.А., Алексеев В.Р., Умнова Л.П. Использование математической модели для исследования адаптации популяций планктонных ракообразных (*Daphnia longispina*) к сезонным изменениям трофических условий // Труды Зоологического института РАН. 1999. Т.279. С.69-81.

PHYSIOLOGICAL ADAPTATION MECHANISMS DAPHNIA MAGNA STRAUS AT DIFFERENT DENSITY PLANTING IN ONE VOLUME OF FREE SPACE

A.A. Chemagin

Tobolsk complex scientific station UrB RAS, Tobolsk, Russia

e-mail: chemagin@pochta.ru

The effect of stocking density on the fecundity of crustaceans and growth. The best was 10 ml of water for one crustacean, crustaceans, and where the size of their fertility were highest, relative to other variants of the experiment.

At higher densities (5 crustaceans/20 ml), life expectancy was 33% higher than in other versions, but fertility – by 3-25% lower, probably due to the redistribution of energy resources for survival and the maintenance of the reproduction capacity at sufficiently high level.

ЗНАЧЕНИЯ pH И АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ РЫБ ОЗЕРА ЧАНЫ

Чернов С. П., Соловьев М. М., Кашинская Е. Н.

Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия

E-mail: yarmak85@mail.ru

Активность пищеварительных ферментов, осуществляющих гидролиз питательных веществ, в том числе у рыб, зависит от различных факторов, одним из которых является значение pH. Строение желудочно-кишечного тракта некоторых видов рыб может отличаться присутствием или отсутствием желудка и пилорических придатков. В зависимости от этого у некоторых видов рыб процесс пищеварения разделяется на кислую и щелочную фазы. Низкий уровень pH в желудке обусловлен секрецией соляной кислоты и определяет кислую фазу пищеварения. При переходе пищевого комка в кишечник происходит нейтрализация соляной кислоты под действием ионов, содержащихся в слизи кишечника, после чего начинается щелочная фаза пищеварения (Кузьмина, 2005). У безжелудочных видов рыб нет кислой фазы пищеварения.

Известно, что пищеварительные ферменты имеют пики активности при различных значениях pH. Например, оптимум функционирования кислых протеаз в желудке многих видов рыб находится в диапазоне pH 2–4 (Кузьмина, 2005), а щелочных протеаз в кишечнике индийского сазана *Catla catla* – при pH 8–11 (Kumar et al., 2007). Часто активность пищеварительных ферментов определяют при оптимальных для его работы значениях pH. Значения оптимумов pH некоторых пищеварительных ферментов находятся за пределами известных физиологических значений pH в желудочно-кишечном тракте рыб. В то же время в кишечнике рыб различные ферменты одновременно работают при одинаковых значениях pH.

В связи с этим цель нашего исследования – сравнить физиологические значения pH в различных отделах желудочно-кишечного тракта рыб со значениями pH оптимумов основных пищеварительных ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на Чановском стационаре ИСиЭЖ СО РАН в период с июня по август 2011 г. Объектом исследования служили половозрелые особи (3+,4+) серебряного карася

(6 экз.), язя (4 экз.), сазана (12 экз.), окуня (9 экз.), судака (7 экз.) и щуки (3 экз. возраста 2+), отловленные в устье реки Каргат (бассейн озера Чаны). Значения рН были определены в желудке (окунь, судак и щука), пилорических придатках (окунь, судак), переднем, среднем и заднем отделах кишечника (все виды, кроме щуки) с помощью портативного рН-метра (Hanna instruments HI 8314) с диаметром электрода 3 мм (HI 1083 В). При измерении значений рН в желудке судак, окунь и щука были разделены на две группы: особи с полным и пустым желудком. Для определения оптимума рН активности ферментов в желудке был использован буферный раствор с диапазоном рН 2-7, в кишечнике – с рН 6-9. Для определения ферментативной активности у рыб извлекали желудочно-кишечный тракт, отделяли желудок от кишечника (вместе с пилорическими придатками), вскрывали и удаляли химус. Из слизистых желудка и кишечника готовили гомогенаты. Для этого к навеске слизистой кишечника добавляли 1.5 мл буферного раствора 0,1 М Tris-HCl (рН 7), а к слизистой желудка такой же объем буферного раствора 0,2 М глицина (рН 6), центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, затем супернатант сливали в новую пробирку и разбавляли соответствующим буферным раствором в 10 раз. После этого определяли активность пищеварительных ферментов. Вся вышеописанная пробоподготовка проводилась на льду. Активность пищеварительных ферментов измерялась при температуре 25⁰ С. Активность щелочных протеиназ определяли с использованием 0.3% азо-казеина (Sigma № 11610) в качестве субстрата (Alarcón et al., 2002) при длине волны 440 нм. Активность кислых протеиназ определяли методом Ансон (Anson, 1938) с использованием гемоглобина в качестве субстрата при длине волны 740 нм. Активность α -амилазы определяли методом Бернфелда (Deguara et al., 2003) с 1% растворимым крахмалом в качестве субстрата при длине волны 540 нм. Активность неспецифических липаз определяли методом Албро с соавторами (Gawlicka et al., 2000) с 0.4 мМ п-нитрофенил-миристатином (Fluka 70124) в качестве субстрата при длине волны 410 нм. Активность неспецифических эстераз определяли методом Прабхакаран и Камбл (Prabhakaran, Kamble, 1995) с 0.27 мМ п-нитрофенилацетатом (Sigma N-8130) в качестве субстрата при длине волны 405 нм. Субстраты для определения общей протеолитической активности и активности α -амилазы готовили на 0.1 М трис-HCL буферном растворе, для определения активности неспецифических эстераз – на 0.1 М фосфатном буферном растворе, для определения активности липазы использовали 24 мМ буферного раствора бикарбоната аммония с добавлением 0.5% тритона X-100 в качестве детергента. Концентрацию растворенного белка в образцах определяли по методу Бредфорда (Bredford, 1975) при длине волны 595 нм. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Spekol 21. Активность исследованных ферментов выражали в условных единицах, усл. ед. (разность показаний спектрофотометра пробы с субстратом и холостой пробы на мг белка за минуту).

Результаты представлены в виде средних значений. Достоверность влияния рН на активность пищеварительных ферментов определяли по непараметрическому критерию Фридмана (на основе ранговых сумм) для связанных выборок. Обработка результатов выполнена с помощью статистического пакета Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Значения рН в различных отделах желудочно-кишечного тракта

У окуня, судака и щуки средние значения рН в желудке с химусом колебались от 3,5 до 4,7 (табл. 1). У тех же видов рыб средние значения рН в пустом желудке находились в диапазоне от 6,7 до 7,1. Нейтральные значения рН в желудке, исследованных рыб в отсутствие питания объясняются прекращением секреции соляной кислоты. Выделением соляной кислоты, напротив, обусловлены кислые значения рН в желудках тех же видов рыб. У судака и окуня значения рН в пилорических придатках находились в диапазоне от 6,6 до 6,7. У всех исследованных видов рыб значения рН в разных отделах кишечника изменялись в пределах от 6,2 до 7,2 (таблица). Достоверных различий между значениями рН в отделах кишечника не обнаружено. Отмеченные нами в пилорических придатках и отделах кишечника слабокислые и нейтральные значения рН связаны с нейтрализацией соляной кислоты ионами, содержащимися в слизи кишечника.

Активность пищеварительных ферментов в буферных растворах с различными значениями рН.

Кислые и щелочные протеазы

У кислых протеаз наблюдается выраженное увеличение активности при значениях pH 2-3 (рис. 1 а). Обычно желудочные железы рыб синтезируют две формы пепсина: пепсин 1 (или А) и пепсин 2 (или В). Пепсин 1 наиболее активно гидролизует гемоглобин в диапазоне значений pH 3–4, пепсин 2 при значениях pH 2–3 (Кузьмина, 2005). Возможно, что пепсин, исследуемых нами хищных рыб так же представлен двумя формами.

Таблица. Значения pH в различных отделах желудочно-кишечного тракта рыб

| Вид | Отдел | Желудок (пустой/полный) | Пилорические придатки | Кишечник | | | Среднее значение в кишечнике |
|-------------------|-------|-------------------------|-----------------------|----------|---------|---------|------------------------------|
| | | | | 1 отдел | 2 отдел | 3 отдел | |
| Серебряный карась | | * | * | 6,9 | 7,1 | 7,2 | 7,1 |
| Язь | | * | * | 6,9 | 7,1 | 6,6 | 6,9 |
| Сазан | | * | * | 6,5 | 6,6 | 6,8 | 6,6 |
| Окунь | | 7,1/3,5 | 6,6 | 6,8 | 6,8 | 6,8 | 6,8 |
| Судак | | 6,7/4,7 | 6,7 | 6,7 | 6,8 | 6,8 | 6,8 |
| Щука | | 6,8/4,6 | * | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 6,2 |

* - отдел отсутствует

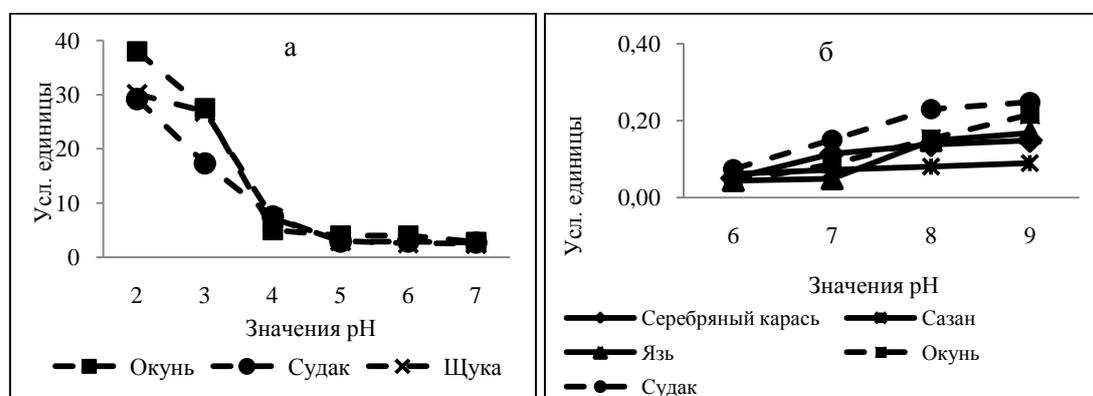


Рис. 1. Общая активность кислых (а) и щелочных (б) протеаз при различных значениях pH

Активность щелочных протеаз в кишечнике с увеличением значений pH увеличивается у всех исследованных видов рыб (рис. 1 б.). Общая активность щелочных протеаз складывается из активностей трипсина, химотрипсина, карбоксипептидаз А и Б, эластазы, дипептидаз и некоторых других ферментов. Все эти гидролазы имеют различные оптимумы pH. Так для трипсина оптимум pH работы у разных видов рыб находится в пределах 8–9, а для химотрипсина в районе 8. Высокий уровень протеолитической активности при значениях pH 9–10 может принадлежать эластазе и коллагеназе (Hidalgo et al., 1999). Таким образом, постепенное увеличение общей активности щелочных протеаз с ростом pH может быть связан с последовательной сменой оптимумов pH работы различных протеаз. Во всех случаях влияние pH на активность ферментов достоверно (при $p < 0,05$).

α-амилаза

Как и в случае щелочных протеаз у всех видов рыб выявлены схожие изменения уровня активности α -амилазы в зависимости от значения pH. Нами отмечены пики активности α -амилазы при значениях pH 7 и 9 (рис. 3 а, б). На примере 5 видов из сем. *Sparidae*, показано наличие нескольких пиков активности α -амилазы при значениях pH от 4 до 9. Присутствие нескольких изоформ α -амилазы в желудочно-кишечном тракте характерно для многих видов рыб. Два пика активности α -амилазы найдено у красного пагелла *Pagellus erythrinus* при значениях pH 7.0 и 9.0 (Fernandez et al., 2001). Это можно объяснить присутствием, по крайней мере, двух изоформ α -амилазы, что характерно для многих видов рыб. Во всех случаях влияние pH на активность ферментов достоверно (при $p < 0,05$).

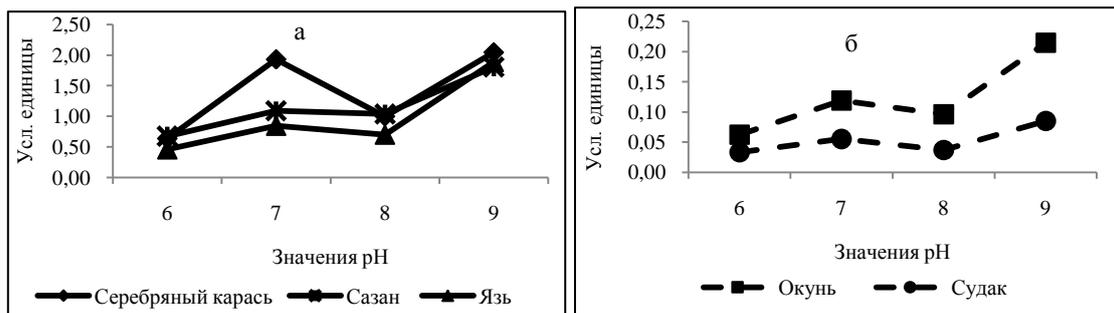


Рис. 3. Активность α -амилазы в кишечнике мирных (а) и хищных рыб (б) при различных значениях рН

Неспецифические липазы и эстеразы

Для неспецифических эстераз и липаз нами также отмечен рост активности при увеличении значений рН. Эти группы пищеварительных ферментов состоят из нескольких изоформ и изоферментов имеющих различные оптимумы рН. Значения оптимума рН липазы для атлантической трески *Gadus morhua* и королевской дорады *Sparus aurata* находятся в районе 8. По нашим данным наибольшая активность липаз и эстераз отмечена при рН 9 (рис. 4 а, б). Таким образом, постепенное увеличение активности неспецифических липаз и эстераз с увеличением значений рН видимо, связано с последовательной сменой оптимумов рН работы ферментов этих групп. Во всех случаях влияние рН на активность ферментов достоверно (при $p < 0,05$).

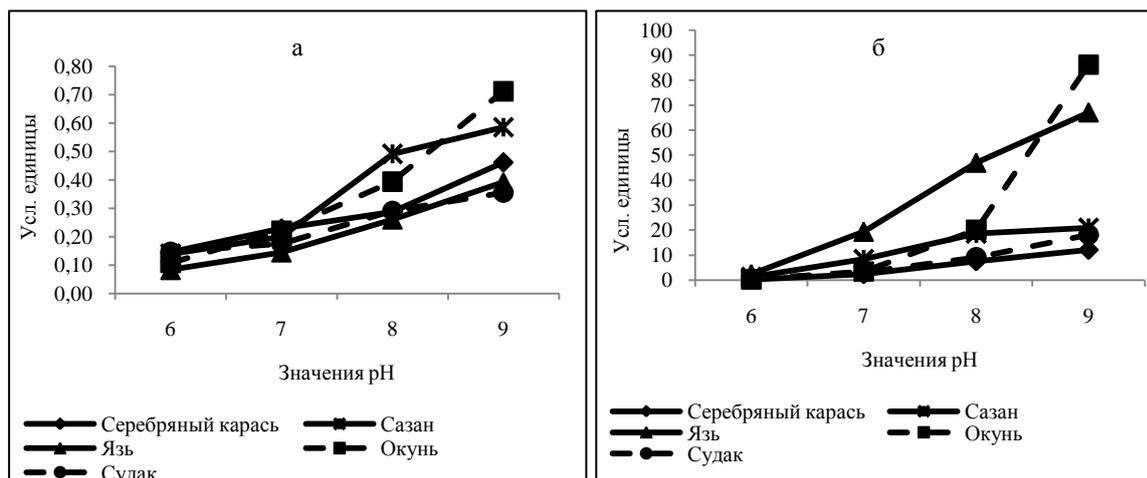


Рис. 3. Активность неспецифических липаз (а) и эстераз (б) при различных значениях рН

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значения рН в различных отделах желудочно-кишечного тракта колеблются в пределах от кислых (желудок) до слабокислых и нейтральных (пилорические придатки и отделы кишечника). У исследованных видов рыб показано сходное влияние значений рН на уровни активностей одноименных ферментов. Один из пиков активности α -амилазы, установленный в эксперименте, совпадает с физиологическими значениями рН в кишечнике, в то время как для других исследованных гидролаз кишечника максимальные значения активностей обнаружены при более высоких значениях рН. Наибольший уровень активности кислых протеаз в желудке отмечен при значениях рН, близких к физиологическим.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб.- М.: Наука, 2005. 300 с.
2. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding / A. Gawlicka, B. Parent, M. H. Horn et al.//Aquaculture. 2000. V. 184. P. 303–314.
3. Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and eathepsin with hemoglobin // J. Gener. Phys. 1938. V.22. № 1. P. 79–83.

4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//Analytical Biochemistry. 1976. V. 72. P. 248–254.
5. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei) / I. Fernandez, F.J. Moyano, M. Diaz, T. Martinez // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2001. V. 262. P. 1–12.
6. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus errugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae)/ F.J. Alarcón, T.F. Martínez, P. Barranco et al.//Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2002. V. 32. P. 265–274.
7. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency/ S. Kumar, F.L. Garcia-Carreno, O. R. Chakrabarti et al.//Aquaculture Nutrition. 2007. V. 13. P. 381–388.
8. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream/ S. Deguara, K. Jauncey, C. Agius//Journal of Fish Biology. 2003. V. 62. P. 1033–1043.
9. Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities//Aquaculture. 1999. V.170. P. 267–283.
10. Prabhakaran S.K., Kamble S.T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German Cockroach, *Blattella germanica* (L.)//Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1995. V. 25. P. 519–524.

PH VALUES AND ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES IN DIGESTIVE TRACTS OF FISHES (CHANY LAKE)

Chernov Sergey, Solovyev Mikhail, Kashinskaya Elena

In this work we have studied different correlations between pH optimum activity of various digestive enzymes and real pH values in digestive tract of fishes. Range of real pH values in stomachs (perch, pikeperch and pike) and different parts of intestine (perch, pikeperch, pike, carp, ide and crucian) were 3,5-4,5 and 6,2-7,2 respectively. The highest values of activity of alkaline protease, nonspecific lipase and esterase were registered in pH range 8-9. The highest values of activity of acid protease were registered in pH range 2-3. We have observed two peaks of activity of α -amylase under pH values 7 and 9. We have concluded that optimums pH activity of alkaline protease, nonspecific lipase and esterase did not correlate with real pH values in digestive tracts of fishes.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКОМОЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ САЗАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА

С.Д. Чернявских, Нгуен Тхи Тьук, То Тхи Бик Тхуи

*Белгородский государственный национальный исследовательский университет «БелГУ»,
Белгород, Россия
e-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru*

У низших позвоночных защитную функцию наряду с лейкоцитами выполняют ядерные эритроциты (Prunescu, 1971). В регуляции многих так называемых диффузионно-контролируемых функций важную роль играет физическое состояние (микровязкость) липидной фазы клеточных мембран (Владимиров, Добрецов 1980). Это в полной мере относится и к процессу активации фагоцитов. Вместе с тем, проблема взаимосвязи функциональной активности фагоцитов и изменения физического состояния клеточных мембран изучена недостаточно, а имеющиеся экспериментальные данные носят противоречивый характер (Пшенникова, 2000; Новицкий и др., 2004).

В настоящей работе показано действие температурного фактора на локомоционную активность и микровязкость мембраны эритроцитов сазана *Suprinus carpio*.

В работе использовали периферическую кровь, взятую из хвостовой вены у наркотизированных эфиром животных (30 особей). В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 ед./мл. Кровь центрифугировали 4 мин при 400 g, отбирали эритроциты и подсчитывали в камере Горяева.

Спонтанную локомоционную активность клеток крови изучали в тесте миграции под агарозой. За основу был взят классический метод (Nelson et al., 1975) в модификации (Федорова и др., 2001). В лунки, вырезанные в агарозном геле, нанесенном на предметное стекло, помещали по 3 мкл суспензии эритроцитов, разведенной изотоническим раствором,

содержащей около 1 млн. клеток. Стекла с эритроцитами инкубировали в среде с 5% содержанием CO₂ при комнатной (22°C) и повышенной (37°C) температурах. Длительность инкубации клеток составляла 2, 4, 6 и 8 часов. По окончании инкубационного периода эритроциты фиксировали в течение часа глутаровым альдегидом и окрашивали азур-эозином. Площадь спонтанной миграции клеток измеряли с помощью анализатора изображений «Видео тест-Размер» 5.0 (ООО «Микроскоп-Сервис», г. Санкт-Петербург).

Для определения микровязкости мембран суспензию эритроцитов разводили до оптической плотности 0,700 ед. (в 0,5 см кювете при длине волны поглощения 650 нм). Клетки с пиреном (*Koh Light*) инкубировали в течение 1 мин при постоянном встряхивании. Конечная концентрация пирена составляла 3 мкМ. Микровязкость мембран определяли методом латеральной диффузии гидрофобного флуоресцентного зонда пирена (C₁₆H₁₀) (Владимиров, Добрецов, 1980). Определение микровязкости основано на образовании эксимеров (возбужденных димеров) пирена (Добрецов, 1989). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофотометре СФ-56 (Ломо Спектр, г. Санкт-Петербург). Микровязкость липидного бислоя эритроцитарных мембран оценивали при длине волны возбуждения 334 нм, зон белок-липидных контактов - при 286 нм. Коэффициент эксимеризации пирена (Fэ/Fм) рассчитывали по отношению интенсивности флуоресценции эксимеров (длина волны испускания 470 нм) и мономеров (длина волны испускания 395 нм). Данный коэффициент находится в обратной зависимости от относительной микровязкости.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием специальных программ на персональном компьютере. Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

В результате проведенных исследований установлено, что при температуре 22°C площадь миграции эритроцитов сазана практически не изменяется, за исключением показателя, полученного при 6-часовом нагревании клеток по сравнению с 4-часовым, где наблюдается его временное снижение (табл. 1).

Таблица 1. Показатели площади миграции эритроцитов сазана, мм²

| Продолжительность инкубации, ч | 2 | 4 | 6 | 8 |
|--------------------------------|-----------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Температура инкубации, °С | | | | |
| 22 | 2,5 ± 0,2 | 2,6 ± 0,2 | 2,4 ± 0,1 [#] | 2,5 ± 0,2 |
| 37 | 2,6 ± 0,2 | 2,5 ± 0,2 ^{&} | 2,4 ± 0,2 [*] | 2,4 ± 0,2 [*] |

Примечание: здесь и в табл. 2: представлены значения M±m; достоверность различий по t-критерию Стьюдента (p<0,05): &- по сравнению с температурой 22°C, * – по сравнению с 2 часами инкубации, # – по сравнению с 4 часами инкубации, @ – по сравнению с 6 часами инкубации.

Данные согласуются с показателями, характеризующими относительную микровязкость эритроцитарной мембраны: при комнатной температуре через 6 часов инкубации по сравнению с 4 часами происходит увеличение микровязкости в зонах аннулярных липидов и липидном бислое (табл. 2).

При температуре 37°C через 6-8 часов инкубации локомоторная активность эритроцитов снижается на 7,7% по сравнению с 2-часовой инкубацией. Зарегистрированное снижение миграционной активности происходит на фоне увеличения показателей относительной микровязкости. Через 4-8 часов инкубации по сравнению с 2 часами разница в зонах белок-липидных контактов Fэ/Fм (286) составила 37,1-43,4%, в липидном бислое Fэ/Fм (334) – 23,0-36,0%.

При 4-часовой инкубации при температуре 37°C отмечается уменьшение показателя площади миграции эритроцитов на 3,8% по сравнению с температурой 22°C (см. табл. 1). При 2-часовой инкубации при повышенной температуре, по сравнению с комнатной, в зонах белок-липидных контактов снижение относительной микровязкости составило 64,9%, при 6-часовой - разница уменьшилась до 12,3%. В липидном бислое при температуре 37°C, по сравнению с

температурой 22°C, через 2 часа инкубации уменьшение относительной микровязкости составило 42,3%, через 6 часов – 9,3%, а 8-часовая инкубация способствовала увеличению изучаемого показателя.

Таблица 2. Коэффициенты относительной микровязкости мембраны эритроцита сазана

| Температура Инкубации, °С | Коэффициенты эксимеризации пирена | Продолжительность инкубации, ч | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 2 | 4 | 6 | 8 |
| 22 | Fэ/Фм (286) | 1.34± 0.02 | 1.38 ± 0.01 | 1.22 ± 0.04*# | 1.24 ± 0.03*# |
| | Fэ/Фм (334) | 2.60 ± 0.06 | 2.73 ± 0.05 | 2.27 ± 0.03*# | 2.63± 0.07@ |
| 37 | Fэ/Фм (286) | 2.21 ± 0.06 ^к | 1.39 ± 0.02* | 1.37 ± 0.01* ^к | 1.25 ± 0.02*#@ |
| | Fэ/Фм (334) | 3.70 ± 0.09 ^к | 2.85 ± 0.05* | 2.48 ± 0.04*# ^к | 2.37 ± 0.05*# ^к |

Примечание: Fэ/Фм (286) - коэффициент эксимеризации пирена, характеризующий микровязкость в зоне белок-липидных контактов; Fэ/Фм (334) – коэффициент эксимеризации пирена, характеризующий микровязкость липидного бислоя; Fэ/Фм – коэффициент эксимеризации пирена ($K_{\text{экс.}} = F_{470} / F_{395}$).

Согласно полученным результатам, а также данным литературы (Выборнова, 1994), при повышенной температуре инкубации происходят изменения микровязкости и, возможно, других характеристик структурной организации мембраны, приводящие к инактивации клеточной подвижности. Повышение относительной микровязкости в зонах белок-липидных контактов и липидном бислое свидетельствует о нарушении стабильности эритроцитарной мембраны и снижении ее текучести. Эти изменения, в свою очередь, ухудшают вязкоэластичные свойства мембраны и повышают ригидность клетки.

Временное снижение локомоционной активности и повышение относительной микровязкости при 6-часовой инкубации в условиях комнатной температуры нивелируются при 8-часовом нагревании, возможно, вследствие включения компенсаторных механизмов (Хочачка и др., 1977).

Таким образом, увеличение длительности инкубации при повышенной температуре способствует снижению локомоционной активности и увеличению относительной микровязкости мембраны эритроцитов сазана. Инактивация миграционной активности эритроцитов сазана при повышении температуры инкубации происходит значительно быстрее, чем нарушение стабильности эритроцитарной мембраны в липидном бислое и, особенно, в зонах белок-липидных контактов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. М., Наука, 1980. 320 с.
2. Выборнова И.И. Механизмы воздействия температурных условий и антропогенных химических факторов на функционирование биологических мембран / И.И. Выборнова, А.Н. Гольцов, С.Ю. Епифанов и др. // Физиология человека. 1994. Т.20, №6. С. 124-136.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липипротейдов // М.: Наука, 1989. с. 191-206.
4. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. Томск: Изд. ТГУ, 2004. 202 с.
5. Пшенникова М.Г. Феномен стресса: эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патол. физиология и эксперим. терапия. №3. 2000. С.20-26.
6. Федорова М.З. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма / М.З. Федорова, В.Н. Левин // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. №5. С. 16-19.
7. Хочачка П. Стратегия биохимических адаптаций / П. Хочачка, Д. Сомеро. М., Мир, 1977. 398 с.
8. Nelson R.D. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes / R.D. Nelson, P.G. Quie, R.L. Simmons // J. Immunol. 1975. v.115. P.1650-1656.
9. Prunesco H. Natural and experimental phagocytosis by erythrocytes in Amfibians // Nature. New Biol. 1971. V. 231. N 22. P. 143-144.

CHANGES OF BOTH LOCOMOTOR ACTIVITY AND RELATIVE MICROVISCOSITY OF EUROPEAN CARP ERYTHROCYTE MEMBRANE UNDER THE TEMPERATURE FACTOR INFLUENCE.

Chernyavskikh S.D., Nguyen Thi Chuc, To Thi Bich Thuy
Belgorod State National Research University «BSU», Belgorod, Russia
e-mail: Chernyavskikh@bsu.edu.ru

In this paper temperature factor effect demonstrated on both locomotor activity and microviscosity of European Carp erythrocyte membrane. Increase of higher temperature incubation duration led to locomotor activity decrease and relative microviscosity increase of fish erythrocyte membrane. Migration activity inactivation of carp blood cells is much faster at raising incubation temperature than integrity violation of erythrocyte membrane lipid bilayer especially in the protein-lipid area connections.

РОЛЬ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ СТРЕСС-РЕАКЦИИ И АДАПТАЦИИ РЫБ К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.

Чуйко Г.М., Подгорная В.А.
ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия, gchuiko@mail.ru

Цель работы – проанализировать и обобщить данные об участии холинергической системы рыб в ответ на действие стрессоров различной природы и установить связь между первичным гормональным ответом и вторичными ответами холинергической системы.

В 1936 г. Г. Селье первый обратил внимание на то, что организм млекопитающих при действии на него различных раздражителей физической или химической природы реагирует появлением ряда неспецифических признаков, три из которых постоянны и принципиально важны: 1) значительное увеличение коркового слоя надпочечников и исчезновение секреторных гранул из клеток железистой ткани; 2) острая инволюция тимико-лимфатической системы; 2) кровоточащие язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. Эти признаки он объединил под названием «общий адаптационный синдром (ОАС) или «стресс». Эта триада отражает характер защитной реакции организма на любое повреждающее воздействие, и является важнейший биологический феноменом, присущим всем живым существам с достаточно высокой степенью структурно-функциональной организации (Панин, 1983).

Многочисленные исследования по различным вопросам стресса и интенсивное развитие учения о стрессе привело к тому, что к настоящему времени оно вышло за рамки триады Селье. По своей феноменологии стресс оказался значительно сложнее. В процессе получения новых знаний, понятие стресса постоянно расширяется. Имеются множество различных определений стресса (Adams, 1990). Однако все они сводятся к одному биологическому значению: стресс – это способ достижения резистентности организма при действии на него любого возмущающего фактора. Стресс - это неспецифическая метаболическая ответная реакция организма на действие стрессора, т.е. фактора, вызывающего его. Стресс является первым этапом любой адаптивной реакции. В зависимости от силы и продолжительности воздействия стрессора, организм либо адаптируется, либо в нем развиваются патологические процессы, приводящие в конечном итоге к гибели организма. В соответствие с этим Селье выделил три фазы генерализованного, т.е. на уровне целого организма, стресс-ответа: фазы тревоги, резистентности и истощения. Каждая из этих фаз характеризуется своим уровнем метаболизма. При достижении адаптации к действию стрессора значения каждого метаболического параметра могут вернуться к исходному уровню, либо выйти на повышенный или пониженный уровень и оставаться такими, незначительно варьируя около него, достаточно продолжительное время, пока длится фаза резистентности. Однако при наступлении фазы истощения показатели метаболизма неконтролируемо, нескоординировано и достаточно резко начинают снижаться или возрастать вплоть до момента гибели организма (Heath, 1995).

За последние десятилетия появилось много работ, указывающих на важную роль в пусковых механизмах стресса центральной нервной системы (ЦНС) животных, ее эмоциональной сферы, реализующей свое влияние на метаболизм через гипоталамические центры. В настоящее время общепризнанна ключевая роль двух основных систем организма в развитие стресса: гипоталамо-симпатико-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-

надпочечниковой (Панин, 1983). У рыб это соответственно гипоталамо-симпатико-хромафинная и гипоталамо-гипофизарно-интерреналовая оси (Wendelaar Bonga, 1997).

В общих чертах развитие стресса у рыб происходит по схожей схеме, что у млекопитающих и птиц (Thomas, 1990; Wendelaar Bonga, 1997). Неблагоприятные раздражители (стрессоры) воспринимаются внешними или внутренними органами чувств, которые передают информацию в гипоталамус, интегративный орган мозга рыб. От некоторых нейронов в гипоталамусе афферентные нервные пути проходят через симпатические ганглии к хромаффинным клеткам, которые у рыб обычно выстилают стенки задних кардинальных вен или ассоциированы с головной почкой. Хромаффинные клетки в ответ на возбуждение быстро секретируют катехоламины (КА) - адреналин и норадреналин; повышенное содержание которых в плазме крови регистрируется уже через несколько минут и на этом уровне может сохраняться в течение нескольких часов. Другие нейроны в гипоталамусе, аксоны которых оканчиваются вблизи кортикотропных клеток в передней доле гипофиза, в ответ на возбуждение секретируют пептид - кортикотропин релизинг-фактор, который в свою очередь стимулирует выброс из гипофиза адренокортикотропина в кровь. Адренокортикотропин, по системе периферического кровообращения достигает интерреналовой железы, где он стимулирует продукцию и выброс глюкокортикостероидных гормонов (ГКС) в кровь (преимущественно кортизол у большинства костистых рыб).

Гиперсекреция КА и ГКС, обозначаемая как первичный стресс-ответ, по очереди запускает широкий набор биохимических и физиологических изменений, называемых вторичными ответами. Метаболические ответы включают гипергликемию, гиперлактемию, истощение запасов тканевого гликогена, катаболизм мышечных белков и изменение уровня белков крови, холестерина и свободных жирных кислот, усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ), изменяют активность ферментов и др. КА вызывают начальный краткосрочный подъем уровня глюкозы в плазме за счет трансформации резервов гликогена в печени (гликогенолиз), в то время как ГКС поддерживает содержание глюкозы на высоком уровне, стимулируя катаболизм белков и глюконеогенез.

Этот генерализованный эндокринный ответ, в результате которого мобилизуются резервы энергии, разворачивается как адаптивный механизм, позволяющий организму встретить повышенные энергетические запросы в течение воздействия или сопротивления действию стрессора. Обычно эти биохимические изменения сохраняются только в течение нескольких дней после того, как рыбы были подвергнуты острому действию стрессогенных факторов.

В противоположность острому, хроническое и достаточное по силе воздействие стрессоров может индуцировать набор патологических изменений на уровне целого организма, таких как замедление роста, уменьшение сопротивляемости травматическим процедурам и физическим энергоемким нагрузкам, снижение устойчивости к болезням и репродуктивной эффективности, что принято называть третичными стресс-ответами (Thomas, 1990). Однако причинно-следственные связи между первичными, вторичными и третичными стресс-ответами у рыб еще изучены мало.

На сегодняшний день для млекопитающих механизмы стресса изучены более полно, чем для рыб. Первичный стресс-ответ у млекопитающих включает одновременную активацию многих нейромедиаторных систем, и в том числе, адренергические и холинергические структуры в нервной системе (Панин, 1983; Федоров, 1991).

Холинергическая система включает: ацетилхолин (АХ) – медиатор передачи сигнала в синапсе, центральное звено; холинорецептор (ХР) – субмолекулярная структура белковой природы, локализованная на постсинаптической мембране, в результате связывания АХ с которой в постсинаптической мембране генерируется электрический потенциал; ацетилхолинэстераза (АХЭ, КФ 3.1.1.7) – фермент, расщепляющий АХ до неактивных продуктов – уксусной кислоты и холина; холинацетилаза – фермент, участвующий в синтезе АХ.

АХ и АХЭ являются наиболее реактивными и лабильными элементами холинергической системы, взаиморегулирующих содержание друг друга. Избыток АХ тормозит активность АХЭ и активирует её синтез *de novo*. В тоже время, гидролиз АХ, АХЭ снижает его содержание. Показано, что у щуки в обонятельной луковице (передний мозг) в процессе посттетанической потенции (ПТП) содержание АХ снижается, а концентрация АХЭ повышается до 180%

контроля в течение 20 мин. Содержание АХЭ осуществляется за счет экспрессии генов раннего ответа и синтеза ферментного белка *de novo* (Ружинская, Гдовский, 2005).

У млекопитающих и птиц показано участие холинергической системы в формировании стресса. Отмечено, что при возникновении стрессов холинергической системе головного мозга принадлежит триггерная роль. В этой связи ацетилхолин рассматривается в качестве центрального нейромедиатора, выделяющегося в больших количествах в структурах ЦНС и запускающего процесс, вызванный стрессорными раздражителями. Холинергическая система активирует центры симпатической нервной системы, запуская симпато-адреналовый комплекс и индуцируя выброс катехоламинов из хромоаффинной ткани коры надпочечников. При естественном течении стрессорной реакции холинергическая система активирует адренергическую (Панин, 1983; Федоров, 1991). Повышение активности холинергической системы головного мозга у млекопитающих наблюдаются уже в первые секунды стресса. В частности повышается активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в мозге, однако количественные изменения в различных его отделах и структурах не одинаковы и в значительной степени зависят от характера воздействия. Холинергические структуры могут быть активированы напрямую или их активация может быть индуцирована адреналином (Панин, 1983; Федоров, 1991; Чуйко и др., 2011; Pavlov et al., 1994).

На окуне (*Perca fluviatilis* L) исследовано влияние инъекции экзогенного катехоламина адреналина. Показано, что увеличение активности АХЭ в мозге рыб наряду с гипергликемией является частью ответа на стресс, индуцированный инъекцией экзогенного адреналина. Изменения активности АХЭ в мозге окуня носили двухфазный характер: через 30 мин после инъекции активность снижается до 40% от контроля, но затем в течение 4 часов возрастает до 140-160% и остается повышенной, по крайней мере, трое суток (Pavlov et al., 1994). Общая направленность индуцированных адреналином изменений активности АХЭ в мозге окуня сходна с той, что обнаружена в подобных экспериментах на крысах.

На стерляди (*Acipenser ruthenus* Linneaus) исследовано влияние инъекции искусственного аналога глюкокортикостероидного гормона кортизола - дексаметазона, и хэндлинга на активность ХЭ и содержания водорастворимых белков (ВРБ) в мозге рыб (Чуйко и др., 2011). У инъекцированных рыб по сравнению с интактными активность ХЭ уже на 1 сутки эксперимента достоверно возросла (178%) и практически не изменялась до 14 суток. Лишь на 21 сутки её уровень несколько снизился и, хотя по-прежнему был достаточно высоким, но различия относительно исходного уровня стали не достоверными. Динамика содержания ВРБ была такая же, как активности ХЭ, но изменения были более выражены и достигали свыше 200% от начального уровня. У подвергнутых хендлингу рыб активность ХЭ в мозге, постепенно возрастая, лишь на 14 сутки эксперимента стала достоверно выше (168%), чем у интактной стерляди, и сохранялась на этом уровне до конца эксперимента. Содержание ВРБ на 3 сутки достигло достоверно более высоких значений (166%) и оставалось практически без изменений до 14 суток, а к 21 суткам опустилось до начального уровня. Выявленные изменения указывают, что как хендлинг, так и инъекция дексаметазона влияют на активность холинергической системы и интенсивность метаболизма белков в мозге стерляди, активируя оба процесса. Однако хендлинг в отличие от инъекции глюкокортикостероида вызывает более сглаженное действие. Эти различия могут быть связаны с тем, что при хендлинге в организме стерляди образуются только эндогенные катехоламины и глюкокортикостероиды, а при инъекции вводится и дополнительный экзогенный глюкокортикостероид. Обращает на себя внимание, что как при хендлинге и при инъекции дексаметазона у стерляди, так и при инъекции адреналина у окуня максимальное повышение активности ХЭ в мозге составляет 160-170% от исходного уровня независимо от того, на какие сутки после воздействия оно наблюдается. Во всех случаях это повышение носит стрессогенный характер. Эти данные хорошо согласуются с общепринятой концепцией регулирования активности ферментов у высших многоклеточных организмов путем индукции и репрессии их синтеза под влиянием гормонов. Наблюдаемое у рыб стойкое повышение активности ХЭ в мозге связано, скорее всего, именно с синтезом дополнительного количества фермента *de novo* и механизм этого синтеза, видимо, такой же, как и у млекопитающих. В пользу такого утверждения указывает и увеличение содержания ВРБ в мозге стерляди при хендлинге и инъекции дексаметазона.

Один из ключевых биологических циклов в организме рыб - репродуктивный. Как правило, все остальные биоциклы связаны с ним и направлены на его обеспечение (Шульман 1972). Анализ сезонной динамики активности АХЭ в среднем и промежуточном мозге окуня показывает, что ее пик по срокам совпадает с нерестовым периодом данного вида в Рыбинском водохранилище: он наблюдается в конце апреля или начале мая, когда среднесуточная температура воды достигает 8°C (Чуйко, Козловская, 1989). Продолжительность нереста до двух недель. Связь изменений активности АХЭ в мозге рыб с нерестом недавно была подтверждена экспериментальным путем в лабораторных условиях. Было показано, что нерест, искусственно вызванный у мозамбикской тиляпии *Oreochromis mossambicus* путем уменьшения минерализации воды, сопровождается возрастанием активности АХЭ в ее мозге (Pavlov, 1994).

Как известно, нерест является экстремально стрессирующим периодом в жизни рыб и связан с активизацией всех нейрогуморальных систем организма (Шульман 1972). В период нереста и подготовки к нему у рыб усиливается активность практически всей гормональной системы. Показано, что перед нерестом у рыб возрастает в крови количество гормонов гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы, пролактина, катехоламинов, кортикостероидов, включая кортизол. В преднерестово-нерестовом состоянии все биохимические, физиологические и поведенческие ресурсы организма мобилизуются на подготовку и эффективное осуществление процесса воспроизводства: усиливаются обменные процессы, резко активизируется деятельность желез внутренней секреции, значительно увеличивается расход энергетических соединений, происходит созревание половых продуктов, активизируется питание, возрастает двигательная активность рыб (Шульман, 1972). Контроль и регуляция всех изменений, происходящих в этот период в организме рыб, осуществляется нейрогуморальной системой, в частности средним и промежуточным отделами мозга. Средний мозг является у рыб важнейшим сенсорно-координационным центром нервной системы, на уровне которого происходит координация всей деятельности организма в ответ на внешние и внутренние раздражители. В состав промежуточного мозга входят эпифиз, гипофиз и гипоталамус – нейросекреторные отделы, играющие центральную роль в процессах взаимоотношения организма со средой, включая его сезонные перестройки и формирование стресс-ответа. Деятельность этих отделов мозга у рыб в период нереста усиливается, что, очевидно, и обуславливает повышение активности АХЭ.

В общих чертах сезонный цикл активности АХЭ в целом мозге плотвы подчиняется тем же закономерностям, что и у окуня в среднем и промежуточном мозге, но ее максимум наблюдается не в апреле-мае, а в июне (Chuiiko et al., 1997). Вероятнее всего это связано с тем, что плотва в Рыбинском водохранилище обычно нерестится на 15-20 дней позже окуня: в середине мая, когда средняя суточная температура воды достигает 12-14°C. Следует отметить, что иногда обычный ход сезонных изменений активности АХЭ мозга может нарушаться. Такое нарушение было отмечено у плотвы в период с лета 1988 до лета 1989 гг. Активность АХЭ в этот период вместо ожидаемого снижения после весеннего пика продолжала достоверно ($p < 0.05$) возрастать в течение осени 1988 г. вплоть до января 1989 г., когда она достигла своих наивысших значений, сопоставимых с обычными июньскими. После этого активность АХЭ стала снижаться, все еще оставаясь достоверно более высокой для этого периода года, и лишь в июне 1989 г. она вернулась к своим обычным значениям, и нормальный сезонный цикл возобновился. Следует подчеркнуть, что такой аномальный цикл активности фермента происходил на фоне нарушений репродуктивного цикла плотвы в Рыбинском водохранилище в этот период. По некоторым данным в 1988-89 гг. у рыб были отмечены нарушения обмена кальция в плазме и гонадах и связанного с ним вителлогенеза, а как результат – сбой овариального цикла и ухудшение качества половых продуктов. Результаты весенних контрольных наблюдений за нерестом и стандартных осенних обловов сеголеток плотвы сотрудниками ИБВВ РАН (данные А.С. Стрельникова) косвенно подтверждают предыдущие данные: в 1989-90 гг. в посленерестовый период наблюдалось увеличение в нерестовом стаде доли неотнерестившихся особей с выраженной резорбцией гонад и значительное (в 30-40 раз) сокращение количества потомства по сравнению с 1987 г. Одной из возможных причин, вызвавших наблюдаемые отклонения в ходе нормального сезонного течения ферментативного и репродуктивного циклов плотвы, может быть крупная техногенная авария, случившаяся на Череповецком промышленном комплексе зимой 1986-87 гг. В результате аварии произошло

значительное загрязнение промышленными сточными водами всех компонентов экосистемы Рыбинского водохранилища, включая рыб. Превышение фоновых уровней загрязняющих веществ составило сотни и тысячи раз, что повлекло за собой глубокие нарушения на всех уровнях экосистемы, наблюдавшиеся в последующие несколько лет.

Показано, что активность АХЭ и содержание водорастворимых белков (ВРБ) в мозге при хроническом действии (60 сут) сублетальных концентраций кадмия и нафталина на тилляпию (*Oreochromis mossambicus* Peters, 1852) сначала возрастает, а затем снижается до уровня близкого к контролю (Чуйко и др., 2001). Такая же динамика обоих показателей отмечена и после замены токсических растворов на чистую воду и содержания в ней рыб в течение последующих 60 сут. Антихолинэстеразное соединение дихлофос вызывает специфический ответ АХЭ, который проявляется в быстром и устойчивом снижении активности фермента, сохраняющемся на протяжении всего периода контакта рыб с токсикантом, и медленном ее восстановлении до уровня близкого к контролю в чистой воде. Динамика ВРБ при действии дихлофоса такая же, как и при действии двух других исследованных токсикантов. Выявленные изменения носят адаптивный характер и являются частью вторичного ответа в стресс-реакции рыб на действие химических стрессоров.

Таким образом, показано, что холинергическая система рыб принимает участие в формировании вторичного стресс ответа при действии стрессов различной природы: инъекции экзогенного адреналина и дексаметазона, действие специфических и неспецифических токсикантов, «хендлинге», нересте и сезонных изменениях внешних условий окружающей среды. Однако тонкие механизмы этого влияния и взаимоотношение первичного гормонального и вторичного холинергического стресс-ответов, а также их связь с третичными стресс-ответами требуют своего дальнейшего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панин К.Т. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 233 с.
2. Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Активность ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице щуки (*Esox lucius* L.) и ее роль в развитии длительной посттетанической потенциации // Ж. эвол. биохим. физиол. 2005. Т.41. №5. С.426-429.
3. Федоров Б.М. Стресс и система кровообращения. М: Медицина, 1991. 320 с
4. Чуйко Г.М., Козловская В.И. Сезонные изменения активности ацетилхолинэстеразы мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) // В кн.: Физиология и токсикология гидробионтов. Сб-к науч.тр. Ярославль: ЯрГУ, 1989. С.27-38.
5. Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние кортикостероида дексаметазона и хендлинга на активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге и печени стерляди *Acipenser ruthenus* Linneaus // Рыбоводство и рыбное хозяйство. 2011. №7. С.39-43.
6. Чуйко Г. М., Павлов Д. Ф., Подгорная В. А., Степанова В. М. Изменение активности ацетилхолинэстеразы и содержания водорастворимого белка в мозге мозамбикской тилляпии *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) при хроническом действии кадмия, нафталина и дихлофоса // Биол. внутр. вод. 2001. №3. С.72-79.
7. Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М., 1972. 367 с.
8. Adams S.M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish // In: Adams S.M. (Ed) Biological indicators of stress in fish. American Fishery Society Symposium 8. Bethesda: AFS, 1990. P.1-8.
9. Chuiko G.M., Zhelnin Y.Y., Pod'gornaya V.A. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L): a freshwater fish from Northwest of Russia // Comp. Biochem. Physiol. 1997. V.117C. No 3. P. 251-257.
10. Heath A.G. Water pollution and fish physiology. Boca Raton – NY – London – Tokyo: Lewis Publishers, 1995. 359 p.
11. Pavlov D.F. Brain acetylcholinesterase activity in relation to induced reproductive activity in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 109A. N2. P. 231-233
12. Pavlov D.F., Chuiko G.M., Shabrova A.G. Adrenaline Induced Changes of Acetylcholinesterase Activity in the Brain of Perch (*Perca fluviatilis* L.) // Comp. Biochem. Physiol. 1994. V. 108C. N 1. P. 113-115.
13. Thomas P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring // In: Adams S.M. (Ed) Biological indicators of stress in fish. American Fishery Society Symposium 8. Bethesda: AFS, 1990. P.9-28
14. Wendelaar Bonga S.E. The stress response in fish // Physiological Reviews. 1997. V.77. N3. P.591-625.

ROLE OF CHOLINERGIC SYSTEM IN STRESS RESPONSE AND ADAPTATION OF FISH TO ACTION OF ENVIRONMENTAL FACTORS

Chuiko G.M., Podgornaya V.A.

Role of cholinergic system in stress response and adaptation of fish to different environmental factors is analyzed. It is shown fish cholinergic system is involved in the secondary stress responses of fish to action of various stressors such as injection of exogenous adrenaline and dexamethasone, specific and nonspecific toxicants, handling, spawning, and season fluctuations of the environmental factors. However further investigations should be undertaken to study fine mechanisms of such influences and relationships between primary hormonal and secondary cholinergic stress responses and their connection with responses of whole organism.

ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНОВ, А ТАКЖЕ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С РАЗМЕРНО-ВЕСОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ РЫБ СЕМЕЙСТВ ЛОСОСЕВЫЕ (*SALMONIDAE*) И СИГОВЫЕ (*COREGONIDAE*)

М.В. Чурова, О.В. Мещерякова, А.Е. Веселов, О.П. Стерлигова, Н.Н. Немова
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии
Карельского научного центра Российской академии наук, г. Петрозаводск, Россия
mchurova@yandex.ru

Важным аспектом в оценке общего состояния популяции рыб и каждой особи в отдельности является процесс роста. Основным метаболическим фактором, определяющим функциональную активность клеток различных органов и, соответственно, процессы роста и развития рыб, является уровень энергетического обмена. Достаточный уровень образования АТФ определяет активный рост и развитие организма рыб, особенно в период раннего онтогенеза, когда требуются большие энергетические затраты на синтез структурных и запасных соединений. В связи с этим, в исследованиях взаимосвязи биохимических параметров с размерными характеристиками рыб и темпами их роста большое внимание уделяется изучению активности ферментов энергетического обмена, участвующих в процессах аэробного и анаэробного синтеза АТФ. Активность ферментов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи митохондрий, наряду с молекулярно-генетическими показателями – индексом РНК/ДНК и уровнем экспрессии гена тяжелой цепи миозина могут использоваться как индикаторы темпов роста и состояния рыб в исследованиях по изучению влияния различных условий на рост рыб. Например, эти показатели применяются при изучении влияния на рыб загрязнения окружающей среды, изменения температуры, варьирования качества и количества пищи, паразитарной инвазии (Overturf, Hardy, 2001; Imsland et al., 2006; Chícharo, Chícharo, 2008). Изучение биохимических и молекулярно-генетических закономерностей и механизмов формирования изменчивости и дифференциации рыб по размерам позволит значительно расширить представления об особенностях процесса роста у рыб и способов его регуляции в различные периоды онтогенеза и при влиянии экологических условий.

Целью работы было исследование взаимосвязи активности ферментов энергетического и углеводного обмена мышц и печени, уровня экспрессии гена тяжелой цепи миозина, индекса РНК/ДНК в мышцах с длиной и массой рыб некоторых видов семейств Лососевые (*Salmonidae*) и Сиговые (*Coregonidae*) в норме и при антропогенном воздействии на водоем.

В качестве объектов исследования были выбраны особи разных возрастных групп естественных популяций атлантического лосося (*Salmo Salar* Linnaeus, 1758; река Индера, Кольский п-ов), обыкновенного сига (*Coregonus lavaretus* (Linnaeus, 1758); озеро Каменное), ряпушки (*Coregonus albula* (Linnaeus, 1758); оз. Сямозеро), а также искусственно выращиваемая радужная форель (*Parasalmo mykiss*, Walbaum, 1792); Онежское озеро). Исследуемые рыбы были выловлены в летний нагульный период. Также проведено сравнение исследуемых показателей и оценка их взаимосвязи с размерами сига, обитающих в относительно чистом озере Каменное и озере Костомукшское (Республика Карелия), преобразованном в технологический водоём Костомукшского горно-обогадательного

комбината (хвостохранилище). Вода в озере характеризуется высоким содержанием ионов K^+ , Na^+ , Ca^+ , SO_4^{2-} , HCO_3^- , высокой минерализацией (до 645 г/мл), большим количеством мелкодисперсной минеральной взвеси (1,34 мг/л), высоким значением pH (около 8,5) (Состояние водных объектов...2007).

Определяли активность ферментов в белых мышцах и печени рыб. Общую активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ, КФ 1.1.1.49), 1-глицерофосфат-дегидрогеназы (1-ГФДГ, КФ 1.1.1.8) определяли по общепринятым методикам (Кочетов, 1980). Активность альдолазы (КФ 4.1.2.13) определяли по методике Веck в модификации Ананьева и Обуховой (Колб, Камышников, 1976). Активность цитохром *c* оксидазы (ЦО, КФ 1.9.3.1.) в мышцах и печени определяли по методу Смита (Smith, 1955). Концентрации нуклеиновых кислот в мышцах определяли спектрофотометрически (Маниатис и др, 1984). Уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) определяли в белых мышцах методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Концентрацию матричной РНК в виде кДНК определяли по стандартной кривой. Использовали общепринятые статистические методы для анализа полученных данных.

Были выявлены общие закономерности во взаимосвязи исследуемых биохимических и молекулярно-генетических показателей с длиной и массой рыб изучаемых видов. Установлена положительная корреляция активности ферментов мышц аэробного обмена - ЦО и анаэробного обмена - ЛДГ с длиной и массой особей внутри одновозрастных групп рыб из естественных водоемов: молоди лосося, сига и ряпушки (табл. 1). Аналогичная закономерность была показана и для искусственно выращиваемой форели. Также установлена положительная корреляция с массой рыб для активности фермента цикла трикарбоновых кислот – МДГ и фермента гликолиза – альдолазы, характеризующей степень использования углеводов в гликолизе. Полученные результаты указывают на более высокий уровень аэробного и анаэробного обмена, степень использования углеводов в процессах энергетического метаболизма в мышцах рыб у более крупных особей в летний нагульный период.

Таблица 1. Корреляция активности ЦО, ЛДГ, уровня экспрессии гена *MyHC*, индекса РНК/ДНК в мышцах с длиной (АС) и массой особей у разных возрастных групп рыб

| Вид | Возраст | n | Активность ЦО | | Активность ЛДГ | | уровень экспрессии <i>MyHC</i> | | индекс РНК/ДНК | |
|---------|---------|----|---------------|-----------|----------------|-----------|--------------------------------|-----------|----------------|-----------|
| | | | г (АС) | г (масса) | г (АС) | г (масса) | г (АС) | г (масса) | г (АС) | г (масса) |
| Лосось | 0+ | 25 | 0,56* | 0,55* | 0,73* | 0,67* | 0,74* | 0,73* | 0,48* | 0,46* |
| | 1+ | 25 | 0,60* | 0,62* | 0,58* | 0,53* | 0,80* | 0,71* | 0,67* | 0,57* |
| | 2+ | 10 | 0,69* | 0,70* | 0,79* | 0,84* | 0,78* | 0,77* | -0,44 | -0,39 |
| Сиги | 2+ | 9 | 0,86* | 0,75* | 0,51* | 0,79* | 0,55* | 0,82* | -0,62 | -0,52 |
| | 3+ | 9 | 0,71* | 0,73* | 0,46* | 0,78* | 0,82* | 0,92* | 0,84* | 0,62* |
| Ряпушка | 1+ | 20 | 0,84* | 0,75* | 0,68* | 0,73* | - | - | 0,69* | 0,77* |
| | 2+ | 18 | 0,74* | 0,65* | 0,50* | 0,65* | - | - | 0,30 | 0,65* |
| | 3+ | 15 | 0,44* | 0,41 | 0,31 | 0,40* | - | - | -0,45 | -0,41 |
| Форель | 1+ | 20 | 0,65* | 0,78* | 0,45* | 0,69* | 0,71* | 0,72* | 0,56* | 0,49* |
| | 2+ | 15 | 0,52* | 0,51* | 0,53* | 0,64* | 0,82* | 0,78* | 0,50 | 0,48 |

Примечание: * - достоверные значения коэффициента корреляции при $p < 0,05$

Для всех исследуемых видов рыб уровень экспрессии гена тяжелой цепи миозина (*MyHC*) в белых мышцах возрастал с увеличением массы и длины тела одновозрастных особей (табл. 1). Миозин является одним из основных белков в мышце и составляет 50% от количества всех мышечных белков. Согласно ряду исследовательских работ уровень экспрессии гена *MyHC* коррелирует с темпами роста некоторых видов рыб (Overturf, Hardy, 2001; Imsland et al., 2006), и используется как показатель, отражающий темпы прироста мышечной массы и темпов роста рыб в целом. Таким образом, согласно результатам данного исследования более крупные особи отличаются высокими темпами прироста мышечной массы.

Известно, что индекс РНК/ДНК отражает уровень синтеза белков в клетке. Ранее было показано, что значение этого индекса положительно коррелирует с темпами роста лососевых и

других видов рыб (Peragon, 2001; Vinagre, 2008). Согласно результатам нашего исследования характер взаимосвязи РНК/ДНК с размерами исследованных видов рыб различался в зависимости от вида и их возраста (табл. 1). Поскольку данный показатель отражает уровень синтеза всех белков в клетке, то может значительно варьировать на разных стадиях онтогенеза, в зависимости от особенностей экологии вида и типа питания.

Отличительной особенностью взаимосвязи размеров исследованных видов рыб с показателями печени были высокие значения положительной корреляции активности ферментов печени 1-ГФДГ и Г-6-ФДГ с длиной и массой особей, что было показано для лосося, сига, ряпушки, форели (табл. 2). Указанные ферменты играют важную роль в метаболизме печени, процессах, поставляющих предшественники для синтеза нуклеиновых кислот, структурных и запасных липидов. Отмеченная положительная корреляция активностей этих ферментов с длиной и массой особей свидетельствует о более высоком уровне восстановительных процессов в печени у более крупных рыб.

По результатам сравнительного исследования у сигов из озера Костомукшское (хвостохранилища) по сравнению с сигами из чистого озера были установлены некоторые отличия в значении изучаемых показателей и их взаимосвязи с длиной и массой рыб.

Таблица 2. Корреляция активности Г-6-ФДГ, 1-ГФДГ печени с длиной (АС) и массой особей у разных возрастных групп рыб

| Вид | Возраст | n | Активность Г-6-ФДГ | | Активность 1-ГФДГ | |
|---------|---------|----|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| | | | г (АС) | г (масса) | г (АС) | г (масса) |
| Лосось | 1+ | 25 | 0,74* | 0,73* | 0,72* | 0,73* |
| | 2+ | 10 | 0,67* | 0,74* | 0,62* | 0,75* |
| Сиги | 2+ | 9 | 0,75* | 0,82* | 0,82* | 0,64* |
| | 3+ | 9 | 0,65* | 0,89* | 0,77* | 0,89* |
| Ряпушка | 1+ | 20 | 0,55* | 0,69* | 0,50* | 0,64* |
| | 2+ | 18 | 0,59* | 0,73* | 0,53* | 0,65* |
| | 3+ | 15 | 0,59* | 0,78* | 0,54 | 0,69* |
| Форель | 1+ | 20 | 0,53* | 0,87* | 0,49* | 0,54* |
| | 2+ | 15 | 0,34 | 0,93* | 0,41 | 0,75* |

* - достоверные значения коэффициента корреляции при $p < 0,05$

В белых мышцах сигов из хвостохранилища отмечалась более низкая активность ЦО (отличие составило 23%, $p < 0,05$) и более высокая активность ЛДГ (отличие составило 22%, $p < 0,05$) по сравнению с сигами из оз. Каменное, что указывало на низкий уровень аэробного энергетического обмена и высокий уровень анаэробного процесса синтеза АТФ в этой ткани. Кроме того, у сигов из сравниваемых озер наблюдалось различное значение коэффициента корреляции активности ЦО с ЛДГ: у сигов из чистого озера оно было положительным ($r=0,82$, $p < 0,05$), а у рыб из хвостохранилища – отрицательным ($r=-0,71$, $p < 0,05$). Это свидетельствовало о том, что в норме аэробный и анаэробный путь синтеза АТФ функционируют однонаправленно, а в неблагоприятных условиях снижение интенсивности аэробного метаболизма частично компенсируется увеличением уровня анаэробного. Значение показателя РНК/ДНК в белых мышцах сигов, обитающих в хвостохранилище, составило $0,61 \pm 0,07$, что было ниже по сравнению с таковым в мышцах рыб из чистого водоема $1,09 \pm 0,05$ $p < 0,05$. Это указывает на снижение уровня синтеза белков, ухудшение состояния рыб и снижение темпов их роста (Mankiewicz-Woczek et al., 2010). Эти выводы подтверждаются и данными по линейно-весовым характеристикам рыб, свидетельствующими о меньших размерах сигов из неблагоприятного водоема. При исследовании взаимосвязи исследуемых показателей с размерно-весовыми характеристиками сигов, были установлены, как общие особенности, так и различия. В частности, для сигов из обоих озер была характерна положительная взаимосвязь активности ЦО, уровня экспрессии гена миозина и индекса РНК/ДНК белых мышц с размерами особей (табл. 3). Таким образом, несмотря на снижение темпов роста сигов из хвостохранилища, закономерности формирования вариаций по размерам, установленные по перечисленным показателям мышц, аналогичны таковым для сигов из чистого водоема. В

отличие от сигов из озера Каменное для сигов из хвостохранилища не установлена взаимосвязь ЛДГ мышц с массой особей (табл. 3), что вероятно связано с перераспределением интенсивности путей аэробного и анаэробного синтеза АТФ в общем энергообеспечении клеток мышц и усилением роли анаэробного обмена как компенсаторного механизма.

В печени сигов из озера Костомукшское установлены более низкие значения активности ЦО и высокие значения альдолазы, ЛДГ, Г-6-ФДГ по сравнению с таковыми у сигов из озера Каменное, что указывает на снижение уровня аэробного обмена и усиление использования углеводов в гликолизе, пентозо-фосфатного пути окисления углеводов. Корреляция активности ЦО, Г-6-ФДГ, 1-ГФДГ печени с размерами сигов из озера Костомукшское была положительной, что соответствовало характеру взаимосвязи этих ферментов с длиной и массой сигов из озера Каменное.

Таблица 3. Регрессионные уравнения зависимости исследуемых показателей в мышцах от массы тела сигов из сравниваемых озер

| Показатель (y) | озеро | n | уравнение | R ² | r | p |
|-----------------------------|---------------|---|-----------------------|----------------|-------|-------|
| активность ЦО | Каменное | 9 | $y = 0,021x - 0,093$ | 0,53 | 0,73 | <0,05 |
| | Костомукшское | 7 | $y = 0,051x - 1,133$ | 0,74 | 0,86 | <0,01 |
| активность ЛДГ | Каменное | 9 | $y = 0,741x + 70,23$ | 0,61 | 0,78 | <0,05 |
| | Костомукшское | 7 | $y = -1,253x + 235,6$ | 0,30 | -0,55 | НД |
| индекс РНК/ДНК | Каменное | 9 | $y = 0,0071 + 0,51$ | 0,38 | 0,62 | <0,05 |
| | Костомукшское | 7 | $y = 0,015x - 0,459$ | 0,70 | 0,83 | <0,05 |
| экспрессия гена <i>МуНС</i> | Каменное | 9 | $y = 0,015x - 0,70$ | 0,84 | 0,92 | <0,01 |
| | Костомукшское | 7 | $y = 0,037x - 1,656$ | 0,55 | 0,74 | <0,05 |

Таким образом, по результатам исследования установлена положительная корреляция активности ферментов ЦО, ЛДГ, альдолазы в мышцах, активности Г-6-ФДГ и 1-ГФДГ в печени, уровня экспрессии гена *МуНС* в мышцах с длиной и массой особей лосося, сига, ряпушки, форели, выловленных в период нагула (активного питания и роста). Это указывает на то, что эти показатели можно использовать в разработке метода оценки состояния здоровья и контроля темпов роста рыб в различных условиях. Наличие четких отличий в значении перечисленных показателей (в том числе индекса РНК/ДНК) и некоторых различий в характере их взаимосвязи с размерно-весовыми характеристиками особей у сигов, обитающих в водоемах с различной антропогенной нагрузкой, подтверждает возможность их использования в мониторинговых исследованиях водоемов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проект № 11-04-00167-а, Гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» НШ-1642.2012.4, Проектов Программы ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 гг.» (№ г.к. 02.740.11.0700, № г.к. 14.740.11.1034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. 311 с.
2. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
4. Состояние водных объектов Республики Карелия. По результатам мониторинга 1998-2006 гг. Петрозаводск: Карел. Науч. центр РАН, 2007. 210 с.
5. Chicharo M.A., Chicharo L. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology // Int J Mol Sci. 2008. V.9. P.1453-1471.

6. Imsland A.K., Le Francois N.R., Lammare S.G., Ditlecadet D., Sigurosson S., Foss A. Myosin expression levels and enzyme activity in juvenile spotted wolfish (*Anarhichas minor*) muscle: a method for monitoring growth rates // *Can J. Fish Aquat. Sci.* – 2006. – V.63. – P.1959-1967.
7. Mankiewicz-Boczek J., Kaczkowski Z., Godowska M., Zalewski M. RNA/DNA ratio as an indicator of the impact of long-term accumulative contamination for the assessment of river degradation - a pilot study // *Ecohydrology and Hydrobiology*. 2010. P I-VIII. URL: <http://versita.metapress.com/content/c906680500771684/> (дата обращения: 15.03.2011)
8. Overturf K., Hardy R. 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.* 2001. V.32. P.315-322.
9. Peragon J., Barroso J.B., Garcia-Salguero L., Higuera M., Lupianez J.A. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001. V.33. P.1227–1238.
10. Vinagre C., Fonseca V., Maia A., Amara R., Cabral H. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), in the Tagus estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA-DNA ratio // *Journal of Applied Ichthyology*. 2008. V.24. P.163-169.

CORRELATION OF METABOLIC ENZYMES ACTIVITY, RNA/DNA RATIO AND MYOSIN GENE EXPRESSION WITH BODY SIZE OF FISH OF TWO FAMILIES *SALMONIDAE* AND *COREGONIDAE*

M.V. Churova, O.V. Mescheryakova, A.E. Veselov, O.P. Sterligova, N.N. Nemova

The study was designed to elucidate the relationship of several biochemical parameters with weight and length of fish. The objects under study were salmon, whitefish and rainbow trout of different age group. The positive correlation of fish sizes with activity of cytochromre *c* oxidase, lactate dehydrogenase, aldolase in white muscle, activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 1-glycerophosphate dehydrogenase in liver, RNA/DNA ratio and expression of myosin heavy chain gene in white muscle were revealed. There were differences in analyzed parameters between whitefish inhabiting the tailing dump of the iron mining and ore dressing mill and the non affected lake.

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЗАЩИТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ

Шавель Н.А.¹, Заботкина Е.А.², Середняков В.Е.¹

1- Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Россия

2- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Россия

E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

Фагоцитоз относят к одному из древнейших неспецифических защитных механизмов. В первую очередь потому, что он является основой поглощения клеткой нерастворимых частиц (и последующего внутриклеточного пищеварения). У рыб основными клетками, способными к фагоцитозу, являются: макрофаги (как правило, в тканях и органах) и гранулоциты (в периферической крови). Основная масса гранулоцитов периферической крови рыб относится к нейтрофилам (Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 2004). Регистрация процесса фагоцитоза возможна либо по его итогу – количеству поглощенных клеткой частиц, либо по способности клетки к производству активных форм кислорода (АФК) (последнее отслеживается по количеству гранул диформаза, образующегося при реакции АФК с нитросиним тетразолиевым – НСТ-тест).

Процесс фагоцитоза биохимически сложен и зависит от множества факторов среды: температуры, рН, химического состава среды и т.д. (Луценко, 2004; Микряков, 1991). Литературные данные по фагоцитозу у рыб, как правило, связаны с регистрацией итогового фагоцитоза, а данные по НСТ-тесту отрывочны. Недостаточно сведений по влиянию различных факторов на процесс фагоцитоза *in vitro*. Вместе с тем, изучение данного параметра позволяет

оценить как уровень, так и степень развития неспецифической клеточной защиты по отношению к различным факторам среды.

Ионы тяжелых металлов, особенно кадмия, относят к наиболее опасным для гириобионтов токсикантам, способным повреждать различные системы организма, накапливаться в пищевых цепях (Заботкина, Лапирова, 2003). Цель данной работы – оценить вариативные характеристики фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови карпа *in vitro* под действием различных концентраций ионов кадмия в нормальных условиях и нагрузочных тестах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на карпах в возрасте 1+, длиной 14.5 ± 0.9 см и массой 78.8 ± 4.4 г, выращенных на экспериментальной прудовой базе «Сунога» ФГБУН ИБВВ им. И.Д.Папанина РАН. У рыб методом каудэктомии получали цельную кровь, которую собирали в гепаринизированные стеклянные пробирки и термостатировали перед постановкой эксперимента при 26°C в течение 30 мин. Неспецифическую клеточную защиту оценивали по способности клеток (нейтрофилов) к производству активных форм кислорода в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ). Эксперимент по влиянию различных концентраций кадмия на способность клеток к фагоцитозу проводили *in vitro* на цельной крови, добавляя при постановке реакции с НСТ непосредственно в реакционные пробирки раствор хлорида кадмия в физрастворе в концентрации 1М; 0,5М; 0,1М; 0,05М. В контрольные пробирки вместо токсического агента вносили физраствор (0,65%). В качестве стимулирующего агента в нагрузочном тесте использовали 1% р-р зимозана. Схема проведения реакции подробно описана ранее (Заботкина и др., 2009).

После экспозиции на предметные стекла приготавливали мазки, которые высушивали, фиксировали 96° спиртом в течение 15 мин и окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 20 мин.

На каждом мазке подсчитывали не менее 100 нейтрофилов, которые в зависимости от количества образующихся гранул диформаза распределяли в 4 группы:

I - зернистость отсутствует, II - гранулы занимают $<1/3$ цитоплазмы, III - зернистость составляет $<2/3$ цитоплазмы, IV - $>2/3$.

Оценка количества нейтрофилов, способных к фагоцитозу (ДАН) и степени активности фагоцитоза (ИАН) проводилась по формулам:

$\text{ДАН} = (\text{II} + \text{III} + \text{IV}) \cdot 100$, где II, III и IV — количество нейтрофилов соответствующих групп.

$\text{ИАН} = (0 \cdot \text{I} + 1 \cdot \text{II} + 2 \cdot \text{III} + 3 \cdot \text{IV}) \cdot 100$.

Полученные данные обрабатывали статистически в программе Statistica 6.0 и Excel и представляли в виде средних значений и стандартных ошибок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что ионы кадмия оказывают существенное влияние на способность нейтрофилов периферической крови карпа к образованию активных форм кислорода в экспериментах *in vitro*. В спонтанном тесте доля клеток, способных к фагоцитозу, достоверно возрастает по отношению к контролю при наименьшей из рассматриваемых концентраций, тогда как в остальных вариантах не отличается от уровня контрольных значений (Рис. 1).

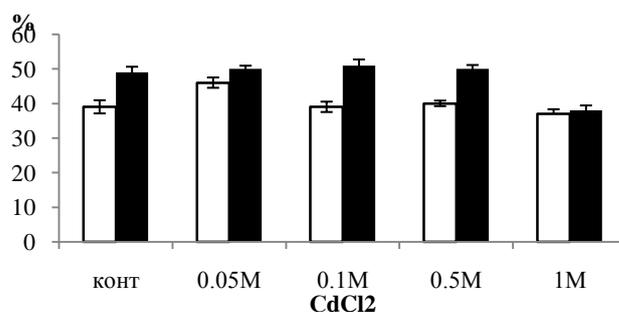


Рис. 1. Доля активированных нейтрофилов при действии различных концентраций ионов кадмия *in vitro*. □ - тест спонтанного фагоцитоза; ■ - тест стимулированного фагоцитоза.

В тесте с нагрузкой (стимулированный фагоцитоз), напротив, доля клеток существенно не отличается от контроля, кроме последнего варианта, с наибольшей концентрацией токсиканта, в котором она значимо снижается. Это позволяет говорить о том, что ионы кадмия стимулируют образование нейтрофилами АФК, но, одновременно, снижают способность клеток к стимуляции посторонними агентами, и, соответственно, снижают уровень неспецифической клеточной защиты.

При оценке индекса активности нейтрофилов, который оценивает уровень выработки АФК, было установлено, что в тесте спонтанного фагоцитоза индекс активности клеток достоверно превышает контроль при наименьшей концентрации ионов кадмия. При увеличении концентрации токсиканта индекс активности клеток снижается и в последнем варианте становится достоверно ниже контрольных значений (Рис. 2).

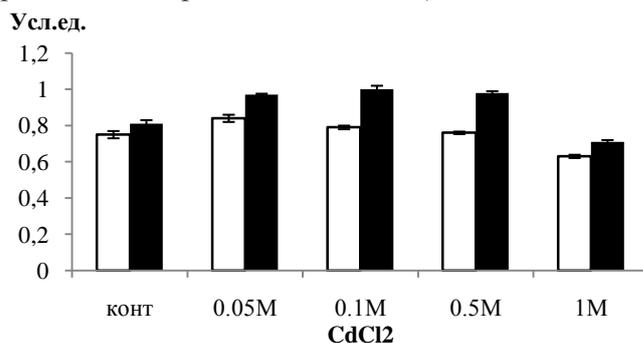


Рис. 2. Индекс активности нейтрофилов при действии различных концентраций ионов кадмия *in vitro*. □ - тест спонтанного фагоцитоза; ■ - тест стимулированного фагоцитоза.

В нагрузочном тесте индекс активности клеток также повышается при концентрации соли кадмия 0.05 М, но остается выше уровня контроля и при концентрациях 0.1 и 0.5 М, а при концентрации 1 М снижается достоверно ниже уровня контроля. Анализ данного показателя свидетельствует, что количество клеток с высоким уровнем АФК увеличивается при добавлении ионов кадмия, но при дальнейшем увеличении концентрации токсиканта, резко снижается. В нагрузочном тесте данная тенденция выражена сильнее.

Известно, что кадмий оказывает значительное влияние на защитные системы организма рыб. Он вызывает усиление индукции С-реактивного белка и металлотионеинов (De Smet et al., 2001), супрессию иммунного ответа к паразитам (Thuvander, 1992), изменяет соотношение лейкоцитов периферической крови в сторону нейтрофилии (Заботкина и др., 2009). По степени воздействия на этот показатель у карпа кадмий в ряду других ТМ стоит первым: Cd > Pb > Cu > Hg.

Ранее нами было показано, что эти показатели значительно отличаются у рыб, которые различаются по степени чувствительности к концентрации кислорода в воде (Заботкина, 2007). Полученные нами результаты подтверждаются подавлением фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови других видов костистых рыб под влиянием ионов кадмия *in vivo* (Лапирова и др., 2009).

Таким образом, добавление ионов кадмия непосредственно в реакционную среду при постановке тестов на фагоцитарную способность нейтрофилов крови карпа показывает активацию неспецифической защиты как за счет увеличения количества клеток, способных к выработке АФК, так и уровня АФК в клетке, при небольших концентрациях токсиканта, но снижению обоих показателей при увеличении концентрации токсиканта, вплоть до отсутствия реакции на нагрузочный тест.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Головина И.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинёв ШТИИНЦА, 1989. 158 с.
2. Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). Ростов н/Д: Изд-во Эверест, 2004. 312 с.
3. Заботкина Е.А. Особенности функциональной активности лейкоцитов периферической крови костистых рыб // Мат-лы Международ. Науч.-практич. Конф. Проблемы иммун., патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов. 2007. С. 23-27.

4. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б. Влияние тяжелых металлов на иммуно-физиологический статус рыб (обзор) // Успехи соврем. биол. 2003. Т. 123. № 4. С. 411-418.
5. Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Назарова Е.А. Влияние ионов кадмия на некоторые морфофункциональные и иммунофизиологические показатели сеголеток речного окуня *Perca fluviatilis* (Perciformes, Percidae) // Вопросы ихтиологии. 2009. Т. 49, № 1. С. 117-124.
6. Лапирова Т.Б., Заботкина Е.А., Балабанова Л.В., Назарова Е.А. Сравнительный анализ иммунофизиологических механизмов реагирования молоди осетра сибирского и карпа обыкновенного на действие кадмия // Вопр. рыболовства, 2009. Т. 10, №1(37). С.81-91.
7. Луценко В.К. Молекулярная патофизиология, М. Наука/Интерпериодика, 2004.-270с.
8. Микряков В.Р. Закономерности формирования приобретенного иммунитета у рыб. Рыбинск, 1991 154 с.
9. De Smet H., De Wachter B., Lobinski R., Blust R. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure // Aquat. Toxicol. 2001. V. 52. № 2. P. 269–281.
10. Thuvander A. 1992. The immune system of salmonid fish: establishment of methods for assessing effects of aquatic pollutants on the immune response // Dissertation Abstr. Int. V. 52. № 2. P. 0216.

ADAPTIVE CAPACITY NONSPECIFIC CELL PROTECTION UNDER THE INFLUENCE OF CADMIUM IONS

Shavel N.A.1, Zabotkina E.A.2, Serebnyakov V.E.1

1 - Yaroslavl State University. PG Demidov, Yaroslavl,

2 - ID Papanin`s Institute for Biology of Inland Waters of RAS, 152 742. Borok, Yaroslavl region, E-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

The results of the investigation of various concentrations of cadmium chloride on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils of carp in vitro experiments using NBT-test.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕКТИННОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МАННАН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS* В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Е.В. Шамшурина^{1,2}, С.Н. Ковальчук^{2,3}, И.Ю. Петрова¹, А.А. Булгаков³, М.Г. Елисейкина¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии науки, Владивосток, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии науки, Владивосток, Россия

E-mail: eshamshurina@rambler.ru

Иммунная система представителей иглокожих - это врожденный конститутивный иммунитет, механизмы которого основаны на наличии образ-распознающих рецепторов взаимодействующих с молекулярными паттернами патогенности. Одним из примеров такого распознавания служит белок-углеводное взаимодействие осуществляемое лектинами - важной составной частью врожденного иммунитета как беспозвоночных, так и позвоночных животных. В частности, широко известна роль представителей маннан-связывающих С-лектинов, коллектинов, в системе врожденного иммунитета человека (Dommert et al., 2006).

Лектины беспозвоночных, в том числе иглокожих, гораздо менее исследованы структурно и функционально, несмотря на большую важность таких работ как в фундаментальном (эволюционном), так и в прикладном аспекте.

У представителя иглокожих – морского ежа *Strongylocentrotus nudus* из целомической жидкости нами выделен лектин, взаимодействующий с остатками маннозы (МСЛ-SN). Установлена его первичная структура и основные физико-химические свойства. Исходя из полученных нами данных лектин является С-лектином сходным с МСЛ позвоночных

животных. Для решения вопроса о гомологии данных лектинов необходимо установить участие МСЛ-SN в защитных реакциях, что явилось целью представленной работы. Были поставлены следующие задачи - изучить динамику содержания МСЛ-SN в целомической жидкости животных в ходе иммунного ответа по данным ИФА и РПГА. Изучить экспрессию гена (-ов), кодирующего МСЛ-SN с использованием qPCR у подопытных животных и сопоставить полученные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на невооруженном морском еже *Strongylocentrotus nudus* (Echinoidea, Regularia). Животных собирали в зал. Восток (зал. Петра Великого, Японского моря) и содержали в аэрируемых аквариумах с проточной водой.

Для определения динамики содержания МСЛ-SN в ходе иммунного ответа животных иммунизировали бактериальным липополисахаридом (ЛПС) (Sigma, США). Раствор ЛПС (4 мкг/мл) готовили на стерильной морской воде (СМВ). В целомическую полость (ЦП) подопытным животным вводили по 1 мл раствора ЛПС. В качестве контроля использовали животных в ЦП которым вводили по 1 мл СМВ. Целомическую жидкость (ЦЖ), 500 мкл, отбирали до иммунизации (контрольная точка) и через 1, 2, 3, 4 дня после начала эксперимента. Затем ЦЖ центрифугировали (1500 об/мин в течении 5 мин), надосадочную жидкость отбирали для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции прямой гемагглютинации (РПГА), осадок клеток использовали для выделения мРНК.

Общую лектинную активность определяли с помощью РПГА трипсинизированных эритроцитов человека 0 группы, агглютинирующих в присутствии МСЛ-SN.

Концентрацию МСЛ-SN в ЦЖ измеряли с помощью ИФА с использованием оригинальных поликлональных кроличьих антител к данному белку, конъюгированных с пероксидазой хрена. Оптическую плотность растворов измеряли при 492 нм на планшетном спектрофотометре (Bio-Tek Instruments, США). Концентрации антигенов в исследуемых образцах рассчитывали по калибровочной кривой.

Для определения уровня экспрессии гена кодирующего МСЛ-SN проводили qПЦР. Тотальную РНК из целомоцитов выделяли с помощью набора Quick-RNA MiniPrep (ZymoResearch, США). Перед проведением обратной транскрипции РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКаз. Реакцию проводили с помощью SMART cDNA Amplification Kit (Clontech США). Для амплификации гена МСЛ использовали следующие праймеры: 5' – AGAGTCACACATAATGACAGGAC – 3' прямой и 3' – TTTCCTCAATTTCGACCCGTG – 5' обратный. Амплификацию контрольного гена – β -актина – использовали в качестве внутреннего стандарта для нормирования образцов. qПЦР проводили в трех повторах для каждой комбинации праймер/образец кДНК, с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в присутствии SYBR Green I (Синтол, Россия), согласно протоколу изготовителя, и прибора MiniOpticon Real-Time PCR Detection System (BioRad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальный ЛПС является универсальным антигеном, широко применяемым для стимуляции иммунного ответа у разных представителей позвоночных и беспозвоночных животных в том числе - иглокожих. В частности, было показано, что введение ЛПС в целомическую полость представителям иглокожих приводит к увеличению экспрессии генов кодирующих белки системы комплемента и другие иммунные молекулы в клетках ЦЖ – целомоцитах (Smith et alю, 1998; Clow et alю, 2000; Nair et alю, 2005).

Известно, что целомоциты иглокожих являются функциональными аналогами клеток крови позвоночных. Они участвуют в распознавании “свое-чужое”, клеточной агрегации и инкапсуляции, фагоцитозе, осуществляют синтез гуморальных факторов иммунитета (Chia, Xing, 1996). В частности, мРНК для МСЛ-SN нами выделена из фракции целомоцитов. Кроме того, с использованием методов иммуноцитохимии было показано, что МСЛ-SN входит в состав секрета морулоподобных целомоцитов. Совокупность полученных данных позволила сделать вывод о том, что морулоподобные целомоциты ответственны за синтез данного белка у морского ежа *S.nudus* (Шамшурина, 2010).

Исследовали динамику концентрации МСЛ-SN в ЦЖ и экспрессии кодирующего его гена в целомоцитах у животных, защитная система которых стимулирована введением в ЦП бактериального ЛПС. Показано, что в течение первых суток после иммунизации у подопытных животных происходит снижение концентрации МСЛ-SN в ЦЖ (по данным ИФА), сопровождающееся, однако, согласно данным qПЦР, незначительным увеличением экспрессии гена в целомоцитах (Рис. 1А). На вторые сутки эксперимента концентрация МСЛ-SN и уровень экспрессии гена достигают своих максимальных значений. Затем (3-4 сутки после иммунизации) эти показатели снижаются (Рис. 1 А). В контрольной группе животных колебания концентрации МСЛ-SN и уровня экспрессии гена были гораздо менее выраженными, при этом, следует отметить, что введение СМВ и микротравмы, наносимые животным в ходе эксперимента, оказывают влияние на иммунную систему. Так концентрация МСЛ-SN снижалась на вторые сутки эксперимента, а затем возрастала. Экспрессия гена незначительно возрастала на первые сутки и снижалась на 2-3 (Рис. 1 Б).

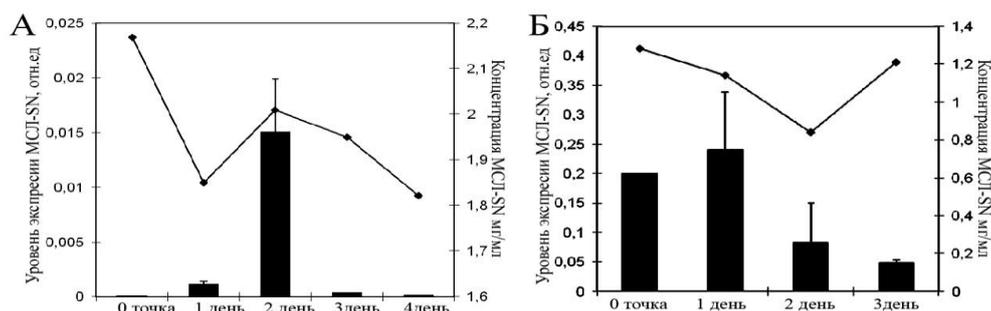


Рис. 1. Соотношение уровня экспрессии гена, кодирующего МСЛ -SN (по данным количественной qПЦР ■) и содержания МСЛ-SN (по данным ИФА ◀) в целомической жидкости морского ежа *S. nudus*: А. В ходе иммунного ответа вызванного инъекцией бактериального ЛПС; Б. контрольное животное, инъекция СМВ.

Наряду с ИФА (специфичным и чувствительным методом детекции белка), содержание лектинов в ЦЖ определяли с использованием РПГА трипсинизированных эритроцитов 0-й группы крови человека, которые в ходе предварительных экспериментов были выбраны нами в качестве тест-системы для определения лектинной активности МСЛ-SN. Было установлено, что данные эритроциты взаимодействуют с МСЛ-SN с более высоким титром гемагглютинации, чем эритроциты других групп крови (Bulgakov et al., 2007). По данным РПГА, у животных экспериментальной группы титр оставался неизменным на протяжении первых двух суток после иммунизации, а затем снижался, тогда, как у контрольной группы титр возрастал через сутки, а затем снижался до контрольных значений (Рис. 2).

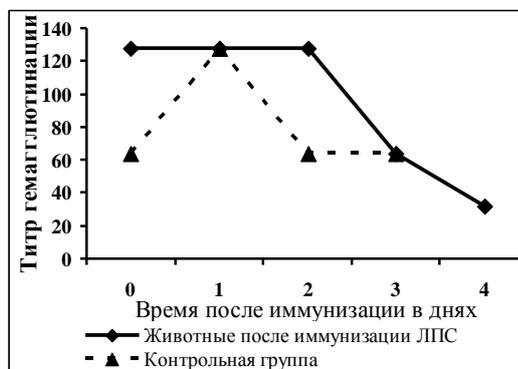


Рис.2. Изменение лектинной активности ЦЖ в ходе иммунизации, по данным РПГА

Неизменный титр гемагглютинации у животных экспериментальной группы на фоне снижения значений в контрольной группе на первых этапах эксперимента, очевидно, отражает влияние процедур взятия ЦЖ на их иммунную систему. При этом, разница в ходе кривых

объясняется низкой избирательностью данного теста, а также тем, что он отражает изменения концентрации не только МСЛ-SN, но и лектинов другой углеводной специфичности, взаимодействующих с углеводными детерминантами на поверхности эритроцитов.

Таким образом, установлено, что стимуляция иммунной системы морского ежа бактериальным ЛПС вызывает изменение содержания МСЛ-SN в целомической жидкости подопытных животных, сопровождаемое колебаниями уровня экспрессии кодирующего его гена в клетках целомической жидкости. Получены данные демонстрирующие участие данного лектина в защитных реакциях *S. nudus*, что указывает на наличие гомологии между МСЛ-SN и МСЛ позвоночных животных. Кроме того, на основании данных количественной ПЦР можно утверждать, что местом биосинтеза МСЛ-SN являются клетки целомической жидкости.

Работа выполнена при поддержке грантов ДВО РАН №12-III-B-06-072, РФФИ № 11-04-01-778-а и гранта правительства Российской Федерации, Договор № 11G34.31.0010.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Dommett R.M., Klein N., Turner M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future//Tissue Antigens. 2006. V.68; N3.-P.193-209.
2. Smith L.C., Shih C.S., Dachenhausen S.G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system// J Immunol. 1998. Volume. 161; № 12. P.6784-6793.
3. Expression of SpC3, the sea urchin complement component, in response to lipopolysaccharide/ Clow L. A., Gross P. S., Shih C. S., Smith L. C.// Immunogenetics. 2000. Volume 51; № 12. P.1021-1033.
4. Macroarray analysis of coelomocyte gene expression in response to LPS in the sea urchin. Identification of unexpected immune diversity in an invertebrate/ Nair S.V., Del Valle H., Gross P.S., et al.// Physiol Genomics. 2005. Volume. 22; №1. P.33-47.
5. Chia F, Xing J. Echinoderm coelomocytes.// Zool. Stud. 1996. № 35. P.231–254.
6. Шамшурина Е.В. Структурная и функциональная характеристика маннан-связывающего лектина морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Автореф.дис...канд. биол. наук.-Владивосток, 2010. 24с.
7. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus*/ Bulgakov A.A., Eliseikina M.G., Petrova I.Y. et al// Glycobiology. 2007. Volume 17; № 12. P.1284–1298

THE CHANGES OF LECTIN ACTIVITY OF COELOMIC FLUID AND EXPRESSION OF THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS NUDUS* MANNAN-BINDING LECTIN GENE IN RESPONSE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE INJECTION

E. V. Samshurina, S. N. Kovalchuk, I. Yu. Petrova, A. A. Bulgakov, M. G. Eliseikina

We have previously characterized the new lectin (MBL-SN) from the coelomic fluid of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. On the basis of peculiarities of the molecular structure and carbohydrate specificity MBL-SN can attribute to the mannan-binding lectins family. It was shown the inoculation of LPS in coelomic cavity of the experimental animals simultaneously generated the increase of MBL-SN gene expression in coelomocytes and the grows of the MBL-SN concentration in the coelomic fluid. These results demonstrated the participation of MBL-SN in immune response of *S. nudus*.

ВИТЕЛЛОГЕНИН ПОЛОСАТОЙ КАМБАЛЫ *LIOPSETTA PINNIFASCIATA* КАК БИОМАРКЕР ЭСТРОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Н.А. Швед, И.Г. Сяпина, В.В. Кумейко

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия
e-mail: nikitawayfarer@yandex.ru*

В последние годы резко возрос интерес биологов к проблеме действия ксенобиотиков – химических веществ, загрязняющих окружающую среду вследствие хозяйственной деятельности человека, – на физиологические функции организма, регулирующиеся гормонами. Многие синтетические химические соединения могут имитировать или блокировать действие естественных гормонов, изменять уровень гормонов в крови и тканевых

жидкостях. Эти вещества, разрушающие эндокринную систему (endocrine disruptors – EDs), приводят к появлению аномалий развития и нарушению репродуктивной функции человека и животных (Arukwe et al., 2003). Основное внимание уделяется выявлению EDs с эстрогенными свойствами (White et al., 1994; Sonnenschein, Soto, 1998), поскольку их действие приводит к “феминизации” мужских особей – явлению, наиболее часто регистрируемому у морских и пресноводных рыб.

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

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

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.

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

Биохимические методы. Плазму эстроген стимулированных рыб освободили от неорганических ионов посредством колоночной хроматографии на носителе Sephadex G 25 coarse. Очистку Vtg проводили методом ионообменной хроматографии на носителе Q-Sepharose с последующей тонкой очисткой Vtg методом гель-фильтрации на носителе Sephadex G 200. Методика выделения вителлогенина подробнее описана в нашей последней работе (Shved et al. 2010).

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

Концентрацию Vtg определяли в плазме крови рыб сэндвич-методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Аликвоту крови 1.5 мл отбирали из жаберной артерии рыб в микропробирки, содержащие 1/10 часть гепарина (активность 5000 МЕ/мл), после чего получали плазму. Подробнее методика описана в последней работе (Shved et al., 2010).

Гистологический и морфометрический анализ. У выловленных рыб брали кусочки органов и фиксировали их в жидкости Буэна или 4% параформальдегиде. Далее материал заливали по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилином–эозином. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом OLYMPUS (Япония), фотографировали с помощью цифровой камеры той же фирмы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения очищенного Vtg его выделяли из плазмы крови самок полосатой камбалы, предварительно стимулированных синтетическим эстрогеном – гексэстролом. По данным нашего исследования концентрация белка в плазме крови полосатой камбалы *L. pinnifasciata* увеличилась с 15 до 35.5 мг/мл через 10 сут после инъекции гексэстрола, что отражает закономерности, установленные другими исследователями (Norberg, 1995; Heppell, Sullivan, 1999).

Профиль элюции ионообменной хроматографии отразил несколько пиков выхода белков, элюция Vtg происходила в диапазоне концентраций NaCl 0.35–0.5 М (Рис. 1), что в целом соответствует результатам Брайна с соавторами (Brion et al., 2000). Картина электрофоретического разделения Vtg разных видов рыб различается как по массе полипептидов, так и по их количеству. При денатурирующем электрофорезе в присутствии ДДС в восстанавливающих условиях Vtg радужной форели *O. mykiss* распадается на четыре полипептида массой 240, 170, 90 и 30 кДа (Brion et al., 2000).

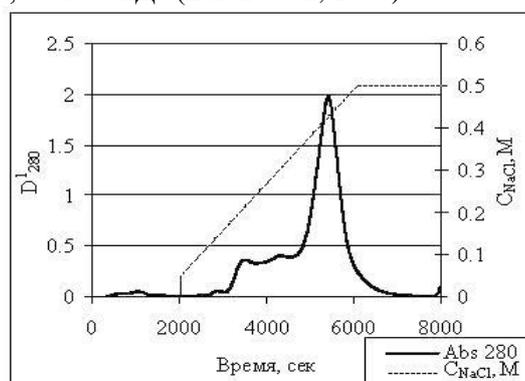


Рис. 1. Профиль элюции раствора белков плазмы крови полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* на носителе Q-Sepharose. D^1_{280} – оптическая плотность элюата при $\lambda = 280$ нм, C_{NaCl} , М – концентрация NaCl, М.

У палтуса *H. hippoglossus* и морского окуня *M. microlepis* при тех же условиях преобладает одна полоса Vtg массой 160 кДа (Norberg, 1995) и 183 кДа (Heppell, Sullivan, 1999) соответственно. Вителлогенин полосатой камбалы *L. pinnifasciata* в присутствии ДДС разделился на несколько полипептидов, масса которых соответствует 180, 98, 70, 52, 41 и 37 кДа. В условиях нативного электрофореза подтверждена гомогенность Vtg. Таким образом, мы установили, что все полипептиды полосатой камбалы, идентифицируемые при денатурирующем электрофорезе, представляют собой единый белковый комплекс, характерный для Vtg (Рис. 2).

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

Перед процедурой определения концентрации Vtg в плазме крови камбал, проведена калибровка иммуноферментного анализа. Трансформирование значений концентраций Vtg и оптической плотности раствора с помощью десятичного логарифмирования позволило получить линейную форму зависимости оптической плотности продуктов реакции от концентрации Vtg в диапазоне от 156 нг/мл до 2.5 мкг/мл.

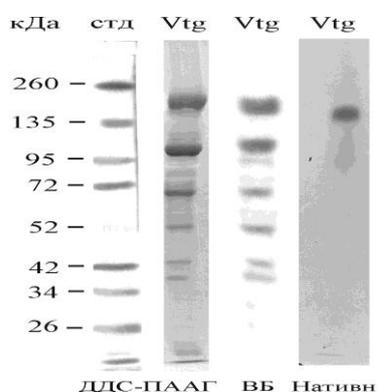


Рис. 2. Картина электрофоретического разделения в денатурирующих (ДДС–ПААГ), нативных (Нативн.) условиях и вестерн-блоттинга (ВБ) очищенного вителлогенина (Vtg) полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* Стд – белки-маркеры молекулярных масс.

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

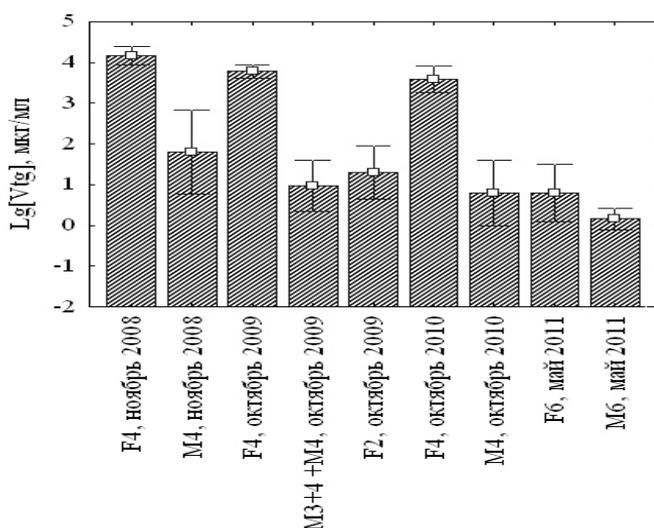


Рис. 3. Уровни вителлогенина в плазме крови полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива. По оси абсцисс – выборки самок (F) и самцов (M) с разной степенью зрелости гонад, по оси ординат – десятичный логарифм средних концентраций Vtg \pm стандартное отклонение.

Вителлогенин также обнаружен и в плазме крови самцов полосатой камбалы из Амурского залива. В ноябре 2008 г. концентрация Vtg в плазме крови самцов M4 изменялась от уровня, находящегося за пределами определения (<156 нг/мл) до 0.957 мг/мл.

В октябре 2009 г. наибольший уровень Vtg у самцов составил 0.244 мг/мл. Стадии зрелости гонад исследованных самцов несколько различались. Так у самцов M4 в семенниках присутствовали только сперматозоиды, тогда как у менее зрелых самцов (M3+4) в ацинусах семенников наряду со сперматозоидами находились и сперматиды. Концентрации Vtg в плазме крови самцов, выловленных в октябре 2009 г., в ноябре 2008 г. и в октябре 2009 г. и находящихся на стадиях зрелости гонад M3+4 и M4, достоверно не различались. В октябре 2010 г. Vtg обнаружен у всех исследованных самцов, его концентрация изменялась от 0.18 до 294 мкг/мл. Концентрация Vtg в плазме крови самок в этот период варьировала от 0.40 до 14.00 мг/мл.

Сравнение концентраций Vtg у неполовозрелых самок и половозрелых самцов не выявило достоверных отличий (Рис. 3).

У камбал, использованных для определения Vtg в плазме крови, изучена встречаемость четырех наиболее распространенных гистологических изменений в печени: вакуолизации гепатоцитов, наличия базофильных включений в цитоплазме гепатоцитов, кариопикноза и некроза гепатоцитов (Рис. 4).

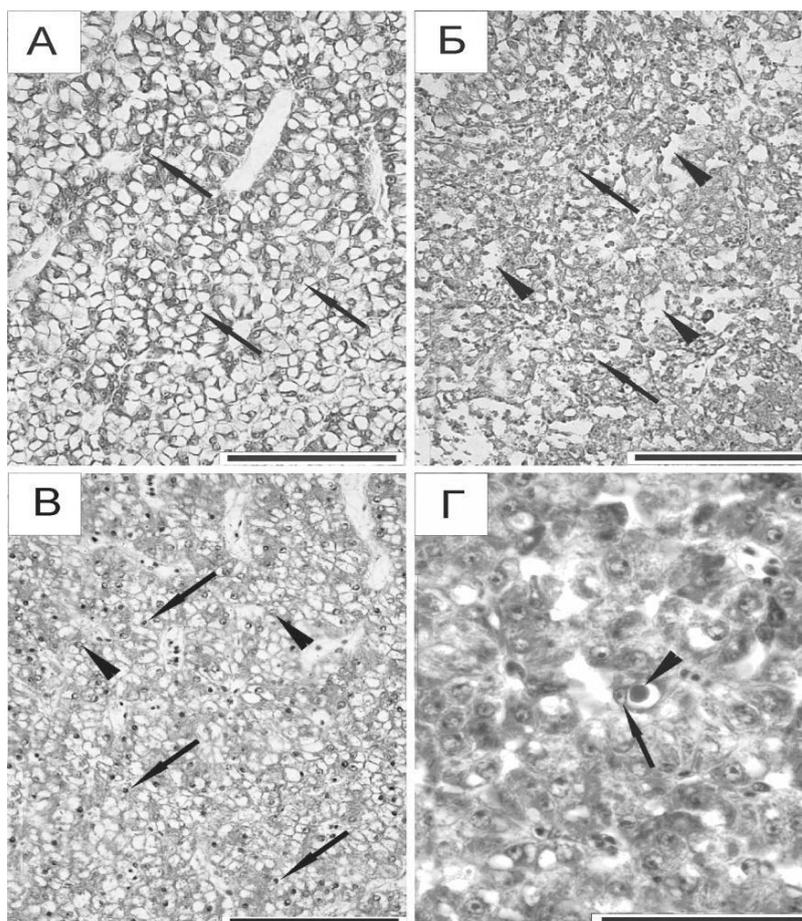


Рис. 4. Основные типы гистологических изменений печени полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из кутовой части Амурского залива: А – вакуолизация гепатоцитов (стрелки); Б – некроз гепатоцитов, узкие стрелки указывают на пикноз ядер гепатоцитов, широкие стрелки на очаги некроза; В – пикнотизированные (узкие стрелки) и нормальные (широкие стрелки) ядра гепатоцитов; Г – базофильное включение в гепатоците (широкая стрелка), узкая стрелка указывает на ядро гепатоцита. Масштабный отрезок А, Б, В – 100 мкм, Г – 50 мкм

Вакуолизация гепатоцитов найдена у 21% рыб с высоким содержанием Vtg (от 7 до 15 мг/мл) в ноябре 2009 г., и у 75% самок с концентрацией Vtg от 15 до 30 мг/мл в 2008 г. Базофильные включения в цитоплазме гепатоцитов, кариопикноз и некроз гепатоцитов чаще выявляли у самок с низким уровнем Vtg: от 5.5 до 15 мг/мл в 2008 г. и от 2 до 7 мг/мл в 2009 г. (табл. 1). Напротив, частота встречаемости кариопикноза и некроза гепатоцитов была выше у самцов камбал с высокими концентрациями Vtg в плазме.

Таблица 1. Встречаемость (%) гистопатологических изменений печени у самцов (М) и самок (F) полосатой камбалы *Liopsetta pinnifasciata* из Амурского залива с разным уровнем вителлогенина (Vtg) в плазме крови

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arukwe A., Goksøyr A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption // *Comp. Hepatol.* 2003. Vol. 2- P.1-21.
2. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic/ R.White, S.Jobling, S.A.Hoarse, et al. // *Endocrinology.*- 1994.-Vol. 135.-P.175-182.
3. Sonnenschein C., Soto A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics, antagonists // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*- 1998.-Vol. 65.-P.143-150.
4. Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence/ U.Bieberstein, T.Berbnner, M.Islinger, T.Braunbeck// *Sci. Total Environ.*- 1999.-Vol. 233.-P.67-75.
5. Shved N.A., Syasina I.G., Kumeiko V.V., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) measurement of vitellogenin in plasma and liver histopathology in barfin plaice *Liopsetta pinnifasciata* from Amursky Bay, Sea of Japan// *Fish Physiol. Biochem.*- 2010. Vol. 37; № 4.-781-99.
6. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М.Егоров, А.П.Осипов, Б.Б.Дзантиев, Е.М.Гаврилова; Высшая школа. М., 1991.-288с.
7. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника.- М.: Советская наука, 1957.-467с.
8. Norberg B. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: induction, isolation, partial characterization// *Fish Physiol. Biochem.*- 1995.-Vol. 14.-P.1-13.
9. Heppell S.A., Sullivan C.V. Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization, use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper// *Fish Physiol. Biochem.*- 1999.-Vol. 20.-P.361-374.
10. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*), chub (*Leuciscus cephalus*)/ F.Brion, F.Rogerieux, P.Noury, et al.// *J. Chromat. B.*- 2000.-Vol. 737.-P.3-12.

VITELLOGENIN OF BARFIN PLAICE *LIOPSETTA PINNIFASCIATA* AS BIOMARKER OF ESTROGEN POLLUTION

N.A. Shved, I.G. Syasina, V.V. Kumeiko

A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

e-mail: nikitawayfarer@yandex.ru

Vitellogenin (Vtg) of the barfin plaice *Liopsetta pinnifasciata* was isolated and purified. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum vitellogenin concentration was developed. The concentration of Vtg in barfin plaice was detected based on the maturity stage of their gonads. It was shown, that juvenile and male fish *Liopsetta pinnifasciata* from the Amursky Bay (Peter the Great Gulf, The Sea of Japan) produce Vtg, that is evidence of estrogen material presence in the bay. For the first time correlation between serum Vtg and liver pathological changes was revealed in flounders from contaminated area.

| | |
|--|----|
| АКСЁНОВА О.В., БОЛОТОВ И.Н., БЕСПАЛАЯ Ю.В. АДАПТАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ К ОБИТАНИЮ В ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ..... | 3 |
| АМИНОВ А.И., ГОЛОВАНОВА И.Л. ЭФФЕКТЫ РАУНДАПА НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ МОЛОДИ РЫБ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ И PH..... | 5 |
| АНДРЕЕВА А.М. ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ КРОВИ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ ЖИДКОЙ СРЕДЫ ОРГАНИЗМА РЫБ..... | 9 |
| АНДРЕЕВА А.М., РЯБЦЕВА И.П., ЛАМАШ Н.Е. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ У РАЗЛИЧНЫХ ПО ЭКОЛОГИИ <i>TELEOSTEI</i> | 15 |
| АНДРЕЕВА А.М., ФЕДОРОВ Р.А. АДАПТАЦИИ ТРАНСКАПИЛЛЯРНОГО ОБМЕНА БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ К ФАКТОРАМ ВНУТРЕННЕЙ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПРЭСНОВОДНЫХ <i>OSTEICHTHYES</i> | 20 |
| АНДРЕЕНКО Т.И. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ МОЛЛЮСКА <i>ANADARA INAEQUIVALVIS BRUGUIERE</i> В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНОКСИИ И ГОЛОДАНИЯ..... | 25 |
| АНДРУСИШИН Т. В., ГРУБИНКО В. В. АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК <i>LÉMNA MINOR L.</i> В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РЕЧКИ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ..... | 29 |
| АРТЕМЕНКО С.В., ПЕТУХОВА Г.А. ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РЕК ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ НА ГИДРОБИОНТОВ..... | 32 |
| БЕДНЯКОВ Д.А., НЕВАЛЕННЫЙ А.Н., НОВИНСКИЙ В.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПРОЦЕСС МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У ВЕСЛОНОСА И СТЕРЛЯДИ..... | 36 |
| БЕДУЛИНА Д.С., ЗАЦЕПИНА О.Г., ПРОТОПОПОВА М.В., ПАВЛИЧЕНКО В.В., ГАРБУЗ Д.Г., ШАТИЛИНА Ж.М., АКСЕНОВ-ГРИБАНОВ Д.В., ГУРКОВ А.Н., ВЕРЕЩАГИНА К.П., КОНДРАТЬЕВА Е.М., ТИМОФЕЕВ М.А., ЕВГЕНЬЕВ М.Б. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСПРЕССИИ И СИНТЕЗА БТШ70 У ДВУХ ВИДОВ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТИ..... | 39 |
| БЕЛОЦИЦЕНКО Е.С. ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ТЕРМОСТРЕССА НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ СТЕРИЛЬНОЙ И ФЕРТИЛЬНОЙ ФОРМ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ <i>AHNFELTIOPSIS FLABELLIFORMIS</i> | 43 |
| БЕЛЬКОВА Н.Л., СУХАНОВА Е.В., МАТЮГИНА Е.Б., ДАГУРОВА О.П. БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КАК МЕХАНИЗМ УСТОЙЧИВОСТИ И АДАПТАЦИИ К ПРИРОДНЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ..... | 47 |
| БОБРОВСКАЯ Н.В., ДОЛМАТОВ И.Ю. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОРСКОЙ ЛИЛИИ <i>HIMEROMETRA ROBUSTIPINNA</i> ПОСЛЕ АУТОТОМИИ..... | 51 |
| БОЛОТОВСКИЙ А.А., ЛЁВИН Б.А. СЕЗОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ УРОВНЯ ТРИЙОДТИРОНИНА У ТРЕХ ВИДОВ КАРПОВЫХ РЫБ ИЗ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА, БАССЕЙН ВОЛГИ..... | 54 |
| БОРВИНСКАЯ Е.В., СУХОВСКАЯ И.В., СМИРНОВ Л.П., НЕМОВА Н.Н. ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ НА ПРИМЕРЕ ФЕРМЕНТА ГЛУТАТИОН S-ТРАНСФЕРАЗЫ РЫБ..... | 57 |
| ВАСИЛЬЕВА О.Б., НАЗАРОВА М.А., РИПАТТИ П.О., НЕМОВА Н.Н. ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ РЫБ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ..... | 60 |
| ВДОВИЧЕНКО Е.А., ВЫСОЦКАЯ Р.У. РОЛЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ В АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ РЫБ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ВОД ОТХОДАМИ ЖЕЛЕЗОРУДНОГО ПРОИЗВОДСТВА..... | 66 |
| ВЕРБИЦКИЙ В.Б., ВЕРБИЦКАЯ Т.И. ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ <i>CLADOCERA</i> ИЗ ЛИТОРАЛИ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА..... | 69 |
| ГАНЖА Е.В. О ПОТЕНЦИАЛЬНОМ РИСКЕ ВЛИЯНИЯ ТРАНСГЕННОГО СЫРЬЯ В ИСКУССТВЕННЫХ КОРМАХ НА ИММУННЫЙ СТАТУС КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РЫБ..... | 72 |
| ГАНЖА Е.В., ПАВЛОВ Е.Д. ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КИЖУЧА <i>ONCORHYNCHUS KISUTCH</i> ВО ВРЕМЯ НЕРЕСТОВОЙ МИГРАЦИИ В РАЗНЫЕ ВОДОЕМЫ П-ОВА КАМЧАТКА..... | 77 |
| ГАРИНА Д.В., СМИРНОВ А.К., КУЗЬМИНА В.В., МЕХТИЕВ А.А. РОЛЬ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА И ЕЁ КОМПОНЕНТА – СЕРОТОНИН-МОДУЛИРУЕМОГО АНТИКОНСОЛИДАЦИОННОГО БЕЛКА В ТЕРМОРЕГУЛЯЦИОННОМ ПОВЕДЕНИИ КАРПА <i>CYPRINUS CARPIO</i> | 80 |
| ГИРИЧ А.С., ДОЛМАТОВ И.Ю., ЛАМАШ Н.Е., ЕЛИСЕЙКИНА М.Г. БЕЛОК <i>WNT5</i> ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОСЛЕ ЭВИСЦЕРАЦИИ У ГОЛОТУРИИ <i>EUPENTACTA FRAUDATRIX</i> | 85 |

| | |
|---|-----|
| ГЛЫЗИНА О.Ю., СУХАНОВА Л.В., САПОЖНИКОВА Ю.П., СМИРНОВ В.В., СМЕРНОВА-ЗАЛУМИ Н.С., ГЛЫЗИН А.В., ТЯГУН М.Л., ЗАЙЦЕВА А.А., БЕЛОМЕСТНЫХ Т.А. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АКВАРИУМНЫЕ СИСТЕМЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИЙ ЭНДЕМИЧНЫХ ГИДРОБИОНТОВ..... | 88 |
| ГНАТИШИНА Л.Л., ФАЛЬФУШИНСКАЯ Г.И., МУДРА А.Е., ТУРТА О.А., ГОРИН О.И., БАЖУРА Я.В., СТОЛЯР О.Б. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ПРЭСНОВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ И ИХ ДЕТЕРМИНАЦИЯ..... | 91 |
| ГОЛОВАНОВ В.К. ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИЯ ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ..... | 95 |
| ГОЛОВАНОВА И.Л. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ..... | 97 |
| ГОЛОВИНА И.В., ГОСТЮХИНА О.Л., ХАНАЙЧЕНКО А.Н., ГИРАГОСОВ В.Е. ВЛИЯНИЕ ПОЛА, СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД, КРАТКОСРОЧНОГО ГОЛОДАНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ <i>PSETTA MAXIMA MAEOTICA</i> | 102 |
| ГОНТАРЬ В.И. ЖИЗНЕННЫЕ СТРАТЕГИИ МШАНОК В СООБЩЕСТВАХ ПЕРИФИТОНА..... | 105 |
| ГРУБИНКО В.В. СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ БЛАГОПОЛУЧИЯ ВОДНЫХ ОРГАНИЗМОВ И ЭКОСИСТЕМ..... | 110 |
| ДЕГТЯРЕВА Л.В., КАРЫГИНА Н.В. СОДЕРЖАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ГРУНТАХ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ ПРИДОННОГО СЛОЯ ВОДЫ..... | 113 |
| ДЗЮБАН А.Н. ЦИКЛ МЕТАНА И ДЕСТРУКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА В ДОННЫХ ОСАДКАХ ТЕХНОГЕННЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ..... | 116 |
| ДМИТРИЕВА А.Э., ФЕДОРОВ Р.А., АНДРЕЕВА А.М. ОЦЕНКА РАЗНООБРАЗИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ Н-ЦЕПЕЙ IG СТЕРЛЯДИ <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> | 120 |
| ДОРОВСКИХ Г.Н., МАЗУР В.В. СОДЕРЖАНИЕ МЕТАЛЛОВ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ, РЫБЕ И ЕЕ ПАРАЗИТАХ В БАССЕЙНАХ РЕК ВЫЧЕГДА И ПЕЧОРА..... | 124 |
| ДОРОХОВА И.И., КУЗЬМИНОВА Н.С. ПОЛОВЫЕ ОТЛИЧИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕЧЕНИ МЕРЛАНГА..... | 127 |
| ЕРОХИНА И.А. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ ЛАСТОНОГИХ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ..... | 130 |
| ЕФРЕМОВА Е.В., ПАШИНА Л.С. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕННОЙ ФЕНОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ ЛИНИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РЫБ РОДА <i>COREGONUS</i> | 133 |
| ЖИГИЛЕВА О.Н. БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ УСТОЙЧИВОСТИ КАРПОВЫХ РЫБ К ТРЕМАТОДОЗАМ..... | 136 |
| ЖИДЕНКО А.А., БАРБУХО Е.В., КРИВОПИША В.В. АДАПТАЦИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ДВУХЛЕТОК КАРПА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ РАУНДАПА И ПРОБИОТИКА..... | 139 |
| ЗАБОТКИНА Е.А. СТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТА РЫБ КАК ОТРАЖЕНИЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ОРГАНИЗМА К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ..... | 143 |
| ЗАПРУДНОВА Р.А. ОБМЕН И РЕГУЛЯЦИЯ КАТИОНОВ У ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ В НОРМАЛЬНЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ..... | 147 |
| ЗАПРУДНОВА Р.А. ЭРИТРОЦИТАРНЫЕ КАТИОНЫ В АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССАХ У РЫБ..... | 150 |
| ЗОТИН А.А., КЛЕЙМЁНОВ С.Ю. ЭНДОГЕННЫЕ РИТМЫ УДЕЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА В ИНДИВИДУАЛЬНОМ РАЗВИТИИ <i>LUMNAEA STAGNALIS</i> (GASTROPODA, LUMNAEIDAE) КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ..... | 154 |
| ИЗВЕКОВА Г.И., СОЛОВЬЕВ М.М., КАШИНСКАЯ Е.Н. ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НАЛИМА, НЕ ЗАРАЖЕННОГО И ЗАРАЖЕННОГО ЦЕСТОДОЙ <i>EUBOTHRIMUM RUGOSUM</i> | 157 |
| КАЗАНЦЕВА Т.Ф., ПЕТУХОВА Г.А. ОЦЕНКА ОТДАЛЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ ПРИ УЧЕТЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ..... | 160 |
| КАМАРДИН Н.Н., ЛЮБИМЦЕВ В.А., ХОЛОДКЕВИЧ С.В., УДАЛОВА Г.П. О ПЕРСПЕКТИВАХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАРКЕРОВ КАРДИОАКТИВНОСТИ МОЛЛЮСКА <i>LITTORITA LITTOREA</i> В ЭКОМОНИТОРИНГЕ МОРСКИХ ЛИТОРАЛЕЙ..... | 163 |
| КАМЕНЕВ Я.О., ДОЛМАТОВ И.Ю. ОСОБЕННОСТИ БЕСПОЛОГО РАЗМНОЖЕНИЯ У ГОЛОТУРИИ <i>CLADOLABES SCHMELTZII</i> | 167 |
| КАПШАЙ Д.С., ГОЛОВАНОВ В.К. ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ РЫБ В СУБЛЕТАЛЬНО ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ..... | 170 |
| КАСУМЯН А.О. УСТОЙЧИВОСТЬ И ПЛАСТИЧНОСТЬ ВКУСОВОЙ РЕЦЕПЦИИ РЫБ К ДЕЙСТВИЮ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ..... | 173 |
| КАШИНСКАЯ Е.Н., СУХАНОВА Е.В., СОЛОВЬЕВ М.М., ИЗВЕКОВА Г.И. РАЗНООБРАЗИЕ СИМБИОНТНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ ОЗ. ЧАНЫ..... | 176 |

| | |
|---|-----|
| КОВЫРШИНА Т.Б. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В КРОВИ БЫЧКА-КРУГЛЯКА (<i>NEOGOBIOUS MELANOSTOMUS</i>) ИЗ ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ..... | 180 |
| КОРНИЛОВ А.Л., ПЕТУХОВА Г.А., КОВАЛЕНКО А.И. ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НА ПИГМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ ИЗ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ВОДОЕМОВ Г. ТЮМЕНИ..... | 184 |
| КРЫЛОВ В.В., ОСИПОВА Е.А. ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТАЦИЙ <i>DAPHNIA MAGNA</i> К ЕСТЕСТВЕННЫМ И ИСКУССТВЕННЫМ ФЛУКТУАЦИЯМ МАГНИТНОГО ПОЛЯ..... | 188 |
| КРЫЛОВА Е.Г. УСТОЙЧИВОСТЬ СЕМЯН ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ..... | 192 |
| КУЗНЕЦОВА Т.В., ТРУСЕВИЧ В.В., КИРИН М.П., ХОЛОДКЕВИЧ С.В. АДАПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ ЧЕРНОМОРСКИХ МИДИЙ <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> LAM. НА ВОЗДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДЕТЕРГЕНТА (ДСН)..... | 196 |
| КУЗЬМИНА В.В. АДАПТАЦИИ ГИДРОЛАЗ КОНСУМЕНТОВ, ЖЕРТВ И ЭНТЕРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ, РЕАЛИЗУЮЩИХ ПРОЦЕССЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ, К УСЛОВИЯМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ..... | 201 |
| КУЗЬМИНА В.В., СОЛОМАТИН Ю.И. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СУТОЧНЫХ ВЕРТИКАЛЬНЫХ МИГРАЦИЙ ЛЕЩА <i>ABRAMIS BRAMA</i> (L.)..... | 205 |
| КУЗЬМИНА В.В., ШАЛЫГИН М.В., ЗОЛОТАРЕВА Г.В., СКВОРЦОВА Е.Г., ШЕНТИЦКИЙ В.А. ВЛИЯНИЕ ТИПА ПИТАНИЯ РЫБ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОТЕИНАЗ ЭНТЕРАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ..... | 210 |
| КУКЛИНА М.М. ВЛИЯНИЕ ЦЕСТОДНОЙ ИНВАЗИИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТОЛСТОКЛЮВОЙ (<i>URIA LOMVIA</i>) И ТОНКОКЛЮВОЙ (<i>U. AALGE</i>) КАЙР БАРЕНЦЕВА МОРЯ..... | 214 |
| КУЛЕВА Н.В. ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМИКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ К АНТРОПОГЕННЫМ ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ..... | 218 |
| КУЛЬКО С.В. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОЦИТОВ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ <i>ANODONTA CYGNEA</i> | 221 |
| ЛАМАШ Н.Е., ДОЛМАТОВ И.Ю. МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ РОЛЬ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ КИШКИ ГОЛОТУРИИ <i>E. FRAUDATRIX</i> | 223 |
| ЛАМАШ Н.Е., КОЦЮБА Е.П., ДЮЙЗЕН И.В. NO-ЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В БОЛЕВЫХ РЕАКЦИЯХ ПРИБРЕЖНЫХ КРАБОВ, ОБИТАЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ..... | 227 |
| ЛЕБЕДЕВА О.А. ИЗУЧЕНИЕ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ <i>BATRACHIUM KAUFFMANNII</i> В ОНТОГЕНЕЗЕ..... | 230 |
| ЛУЦИВ А.И., БОДНАР О.И. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН У <i>CHLORELLA VULGARIS</i> BEIJER ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ..... | 232 |
| ЛЯВРИН Б.З., ХОМЕНЧУК В.А., КУРАНТ В.З. ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА НЕКОТОРЫХ ТКАНЕЙ КАРПА (<i>CYPRINUS CARPIO</i> L.)..... | 236 |
| МАВРИН А.С., МАРТЕМЬЯНОВ В.И. ДИНАМИКА КАТИОНОВ В ПЕЧЕНИ И ГОНАДАХ САМОК ПЛОТВЫ <i>RUTILUS RUTILUS</i> (L.) В ПЕРИОД ВИТЕЛЛОГЕНЕЗА..... | 239 |
| МАРТЕМЬЯНОВ В.И. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ, СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ ФРАКЦИЙ ВОДЫ В ОРГАНИЗМЕ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ..... | 242 |
| МАРТЕМЬЯНОВ В.И. МЕХАНИЗМЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ИОННОГО ГОМЕОСТАЗА ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ ПОСТОЯННЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ..... | 246 |
| МЕХЕД О.Б. ЗАВИСИМОСТЬ НУКЛЕИНОВОГО ГОМЕОСТАЗА КАРПА РАЗНОГО ВОЗРАСТА ОТ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ТОКСИКАНТОВ..... | 251 |
| МЕХТИЕВ А.А., МУСТАФАЕВ Н.ДЖ., ПАЛАТНИКОВ Г.М. АДАПТИВНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СЕРОТОНИН-МОДУЛИРУЕМОГО АНТИКОНСОЛИДАЦИОННОГО БЕЛКА В ТКАНЯХ РЫБ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ..... | 254 |
| МИКОДИНА Е.В. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ КРОВИ РЫБ КАК ПОКАЗАТЕЛИ ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ..... | 259 |
| МИНЗЮК Т.В., КАВЦЕВИЧ Н.Н. БАКТЕРИЦИДНЫЙ КАТИОННЫЙ БЕЛОК В КЛЕТКАХ КРОВИ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ..... | 263 |
| МИХАЙЛОВА Е.С. ВКУСОВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ КЛАССИЧЕСКИХ ВКУСОВЫХ ВЕЩЕСТВ У ЖЕМЧУЖНОГО ГУРАМИ, <i>TRICHOGASTER LEERI</i> | 266 |
| МИЩЕНКО Е.С., ПОРЦЕЛЬ М.Н., НОВИКОВ В.Ю., МУХИН В.А. ОЦЕНКА ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ВСЕЛЕНИЯ КРАБА <i>PARALITHODES SAMTSCHATICUS</i> В БАРЕНЦЕВО МОРЕ..... | 268 |
| НАЗАРОВА М.А., ВАСИЛЬЕВА О.Б., РИПАТТИ П.О., НЕМОВА Н.Н. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТКАНЯХ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ <i>PARASALMO MYKISS</i> (WALBAUM, 1792)..... | 273 |
| ОСТРОУМОВА И.Н. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПИЩЕВЫХ АДАПТАЦИЙ РЫБ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ..... | 277 |

| | |
|---|-----|
| ПАК И.В. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РЫБ (НА ПРИМЕРЕ СИГОВЫХ ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ)..... | 280 |
| ПАЛЬЦЕР И.С. АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ МОРФОЛОГИИ ТЕРМАЛЬНЫХ ВИДОВ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ (СЕМЕЙСТВ LYMNAEIDAE, PLANORBIDAE, THYARIDAE)..... | 281 |
| ПАПЧЕНКОВА Г.А. УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЛИФОСАТСОДЕРЖАЩЕМУ ГЕРБИЦИДУ В РЯДУ ПОКОЛЕНИЙ <i>DAPHNIA MAGNA</i> | 283 |
| ПАЩЕНКО Н.И., КАСУМЯН А.О. ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ОРГАНА ОБОНЯНИЯ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПЕЛАГОФИЛЬНОЙ КАРПОВОЙ РЫБЫ – БЕЛОГО ТОЛСТОЛОБА <i>HYPORHTHALMICHTHYS MOLITRIX</i> | 287 |
| ПЕНЬКОВА Г.А., ГОЛОВАНОВА И.Л. ВЛИЯНИЕ РТУТИ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ГЛИКОЗИДАЗ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ В КИШЕЧНИКЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП..... | 291 |
| ПЕТУХОВА Г.А. АДАПТИВНЫЕ РЕАЦИИ МОЛЛЮСКОВ НА НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ СРЕДЫ..... | 295 |
| ПЕТУХОВА Е.С., ПЕТУХОВА Г.А., ПЕРЕКУПКА А.Г. ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ НА НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ..... | 297 |
| ПИГАЛЕВА Т.А. ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ЦЕЛОМОЦИТОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ (<i>HIRUDO MEDICINALIS</i>)..... | 301 |
| ПРОНИНА Г.И., РЕВЯКИН А.О., ПЕТРУШИН А.Б., ПЕТРУШИН В.А. АДАПТАЦИЯ СОМА ОБЫКНОВЕННОГО (<i>SILURUS GLANIS L.</i>) К УСЛОВИЯМ ВЫРАЩИВАНИЯ И ДОМЕСТИКАЦИИ В УПРАВЛЯЕМЫХ ПРУДОВЫХ ХОЗЯЙСТВАХ..... | 304 |
| РЕШЕТНИКОВ Ю.С., ПОПОВА О.А. РЫБЫ КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЭКОСИСТЕМ..... | 308 |
| РУДНЕВА И.И., ШАЙДА В.Г. МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАННИХ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СТАДИЙ РЫБ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ..... | 312 |
| СЕЛЮКОВ А.Г., ШУМАН Л.А. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛОСОСЕВИДНЫХ РЫБ СУБАРКТИЧЕСКИХ ОЗЁР ЯМАЛА И ГЫДАНА..... | 316 |
| СЕНИК Ю.И., БИЯК В.Я., ХОМЕНЧУК В.А., ГРУБИНКО В.В., КУРАНТ В.З. РОЛЬ ЛИПИДОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ В АДАПТАЦИИ КАРПА К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ ЦИНКА..... | 320 |
| СЕНИК Ю.И., ЛЯВРИН Б.З., ХОМЕНЧУК В.А., КУРАНТ В.З. ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ ЦИНКА И КАДМИЯ НА АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КАРПА..... | 323 |
| СИГАРЕВА Л.Е. РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ КАК ПОКАЗАТЕЛИ УСТОЙЧИВОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПРЕСНОВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ..... | 325 |
| СКУРАТОВСКАЯ Е.Н., ШЕВЧУК С.О. ОСОБЕННОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ МОРСКОГО ЕРША <i>SCORPAENA PORCUS L.</i> | 330 |
| СЛАДКОВА С.В., УДАЛОВА Г.П., ХОЛОДКЕВИЧ С.В. КАРДИОАКТИВНОСТЬ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АДАПТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ РАКОВ <i>SHERAX QUADRICARINATUS</i> , ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД..... | 332 |
| СОЛДАТОВ А.А. ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ГИДРОБИОНТОВ..... | 336 |
| СОЛОВЬЕВ М.М., КАШИНСКАЯ Е.Н., ИЗВЕКОВА Г.И. АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ ОЗЕРА ЧАНЫ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА..... | 340 |
| СУББОТИН А.М., ГНАТЧЕНКО Л.Н., ПЕТУХОВА Г.А. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВЛИЯНИЯ ФИЛЬТРАТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ РЕЛИКТОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИНФУЗОРИЙ (<i>PARAMECIUM CAUDATUM</i>)..... | 344 |
| СУББОТКИНА Т.А., СУББОТКИН М.Ф. АДАПТИВНЫЕ РЕАЦИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА РЫБ..... | 346 |
| ТАЛИКИНА М.Г., КРЫЛОВ В.В. О СПЕЦИФИКЕ ВЛИЯНИЯ ТИПИЧНОЙ МАГНИТНОЙ БУРИ НА ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ПЛОТВЫ (<i>RUTILUS RUTILUS L.</i>)..... | 352 |
| УСЛАМИН Д.В., АЛЕШИНА О.А. ВЛИЯНИЕ СОЛЕННОСТИ НА ПОПУЛЯЦИЮ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ <i>CARASSIUS AURATUS GIBELIO</i> (BLOCH, 1782)..... | 355 |
| ФИЛИППОВ А.А., ГОЛОВАНОВА И.Л., КРЫЛОВ В.В., ИЗЮМОВ Ю.Г., ЧЕБОТАРЕВА Ю.В. ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ РАЗДЕЛЬНОГО И СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИ И МАГНИТНОГО ПОЛЯ В ПЕРИОД ЭМБРИОГЕНЕЗА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИЗА УГЛЕВОДОВ У СЕГОЛЕТКОВ ПЛОТВЫ..... | 358 |
| ХАЛЬКО В.В., ХАЛЬКО Н.А. АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ У МОЛОДИ РЫБ С РАЗНОЙ ЭКОЛОГИЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫХ ОСЦИЛЛЯЦИЙ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ..... | 361 |
| ЧЕМАГИН А.А. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИЙ <i>DAPHNIA MAGNA STRAUS</i> ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПЛОТНОСТИ ПОСАДКИ НА ЕДИНИЦУ ОБЪЕМА СВОБОДНОГО ПРОСТРАНСТВА..... | 365 |
| ЧЕРНОВ С. П., СОЛОВЬЕВ М. М., КАШИНСКАЯ Е. Н. ЗНАЧЕНИЯ PH И АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ РЫБ ОЗЕРА ЧАНЫ..... | 368 |

| | |
|--|-----|
| ЧЕРНЯВСКИХ С.Д., НГУЕН ТХИ ТЪУК, ТО ТХИ БИК ТХУИ ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКОМОЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ САЗАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА..... | 372 |
| ЧУЙКО Г.М., ПОДГОРНАЯ В.А. РОЛЬ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ СТРЕСС-РЕАКЦИИ И АДАПТАЦИИ РЫБ К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ..... | 375 |
| ЧУРОВА М.В., МЕЩЕРЯКОВА О.В., ВЕСЕЛОВ А.Е., СТЕРЛИГОВА О.П., НЕМОВА Н.Н. ВЗАИМОСВЯЗЬ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНОВ, А ТАКЖЕ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С РАЗМЕРНО-ВЕСОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ РЫБ СЕМЕЙСТВ ЛОСОСЕВЫЕ (<i>SALMONIDAE</i>) И СИГОВЫЕ (<i>COREGONIDAE</i>). | 380 |
| ШАВЕЛЬ Н.А., ЗАБОТКИНА Е.А., СЕРЕДНЯКОВ В.Е. АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЗАЩИТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИОНОВ КАДМИЯ | 384 |
| ШАМШУРИНА Е.В., КОВАЛЬЧУК С.Н., ПЕТРОВА И.Ю., БУЛГАКОВ А.А., ЕЛИСЕЙКИНА М.Г. ИЗМЕНЕНИЕ ЛЕКТИННОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МАННАН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА МОРСКОГО ЕЖА <i>STRONGYLOCENTROTUS NUDUS</i> В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА | 387 |
| ШВЕД Н.А., СЯСИНА И.Г., КУМЕЙКО В.В. ВИТЕЛЛОГЕНИН ПОЛОСАТОЙ КАМБАЛЫ <i>LIPSETTA PINNIFASCIATA</i> КАК БИОМАРКЕР ЭСТРОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ..... | 390 |

