

БЕДНЯКОВ ДМИТРИЙ АНДРЕЕВИЧ

**МОДИФИКАЦИОННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ УРОВНЯ
АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ
ФЕРМЕНТОВ У РЫБ**

Специальность: 03.00.13. - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Астрахань - 2004

Работа выполнена на кафедре гидробиологии и общей экологии Астраханского государственного технического университета

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор А.Н. Неваленный

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Воробьев В.И.

кандидат биологических наук Гераскин П.П.

Ведущая организация - Азовский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства.

Защита состоится «**24**» декабря 2004 г. в **12⁰⁰** часов на заседании регионального диссертационного совета ДМ 212.009.01. при Астраханском государственном университете, по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке АГУ по адресу: 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а.

Автореферат разослан «**23**» ноября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, доцент

Ю.В. Нестеров



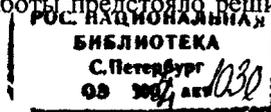
Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Адаптация пищеварительной системы занимает среди других адаптаций особое место в связи с тем, что между уровнем субстратной нагрузки и функционированием желудочно-кишечного тракта, в том числе и уровнем активности пищеварительных ферментов существует тесная связь (Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003). В связи с этим механизм перестройки структуры и функции в ответ на изменение нагрузки имеет важное значение для функционирования пищеварительной системы и организма рыб в целом (обзоры: Хочачка, Сомеро, 1988; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003 и мн.др.). Наиболее доступной моделью для решения фундаментальных проблем адаптации является пищеварительная система. Это связано с тем, что «кишечник является центральным органом, который реализует не только основные процессы переваривания и всасывания пищи, но и регулирование, связывающее собственно желудочно-кишечный тракт с метаболизмом организма благодаря мощной кишечной гормональной (энтериновой) системе» (цит. по: Адаптационно-компенсаторные процессы..., 1991).

В течении последних лет для рыб описаны все известные типы пищеварения, изучены процессы транспорта нутриентов в кишечнике, индуцированного аутолиза (обзор: Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Pavios et al., 2000; Spanggaard et al., 2000; Кузьмина, Скворцова, 2003; Кузьмина и др., 2003; Извекова, Лаптева, 2004). В результате чего пищеварение у рыб в настоящее время описывается как шестизвенный процесс. Тем не менее, механизмы взаимодействия пищевых веществ (модификационные эффекты) в процессе пищеварения в кишечнике рыб остаются до конца не выясненными (Кузьмина, Голованова, 1998; Туктаров, 2002; Неваленный и др., 2001 в, 2003). В то же время результаты, полученные при разработке данных вопросов, необходимы для решения ряда теоретических и прикладных проблем питания и пищеварения у рыб.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы явилось изучение *in vitro* влияния модификаторов различной природы на уровень активности некоторых гидролитических ферментов пищеварительной системы белуги, русского осетра, севрюги, щуки, белого амура, леща, сазана, карася, белого толстолобика, окуня, ерша и берша.

В связи с этим в процессе работы предстояло решить следующие задачи:



1. Исследовать влияние ионов шести металлов четвертого периода Периодической системы химических элементов Д. И. Менделеева (Mn, Fe (II), Co, Ni, Си и Zn) в концентрации 10 мг/л на уровень активности суммарной протеиназы, мальтазы и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб.

2. Изучить влияние углеводов (глюкозы, фруктозы) и аминокислот (глицина, L-глутамина, L-лейцина и DL-β-фенила-α-аланина) на уровень активности мальтазы, щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника рыб.

3. Сопоставить интенсивность гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника 12 видов рыб, относящихся к различным экологическим и систематическим группам, 2% раствора мальтозы, 1% раствора казеина, 0,6 mM раствора п-нитрофенилфосфата Na по отдельности и в присутствии одного или двух веществ, являющихся субстратами при определении активности мальтазы, суммарной протеиназы и щелочной фосфатазы соответственно.

4. Выявить видовые различия характера ответной реакции гидролитических систем кишечника рыб на действие исследованных модификаторов.

Научная новизна работы. Впервые получены данные по исследованию влияния модификаторов различной природы на уровень активности комплекса пищеварительных ферментов (суммарной протеиназы, мальтазы и щелочной фосфатазы) слизистой оболочки кишечника и охарактеризованы процессы полисубстратного пищеварения в кишечнике 12 видов рыб относящихся к различным экологическим и систематическим группам. Произведено сопоставление влияния модификаторов различной природы на уровень активности ферментов в кишечнике осетровых, карповых и окуневых рыб.

Установлено существование регуляторной функции микроэлементов, углеводов, аминокислот, казеина и эфира фосфорной кислоты на уровень активности ферментов в слизистой оболочке кишечника исследованной группы рыб. Продемонстрированы видовые отличия в уровне ответной реакции гидролитических систем, осуществляющих расщепление пищи в кишечнике представителей разных видов, связанные, вероятно, с особенностями систематического положения, биологии и экологии этих рыб.

Установлено, что у рыб, как и у высших позвоночных животных, ферменты, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения являются регулируемыми и способны изменять активность под действием веществ Органической и неорганической природы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты дополняют представления о характере перестроек гидролитических систем при наличии модификаторов различной природы, что свидетельствует о достаточно тонкой адаптации гидролитических систем к составу пищи.

Полученные в работе результаты позволяют сделать вывод о существовании значительного влияния, оказываемого модификаторами органической и неорганической природы, на процесс усвоения пищи, что необходимо использовать при разработке рецептур кормосмесей для объектов аквакультуры.

Материалы диссертационной работы включены в лекционные курсы по энзимологии в Астраханском государственном техническом университете.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы представлялись на III Всероссийской научной конференции "Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия" (Астрахань, 2000), Международной научно-практической конференции посвященной 70-летию КГТУ (Калининград, 2000), Международной конференции «Aquaculture Europe» (Тронхейм, Норвегия, 2001), Международной конференции «Aquaculture Europe» (Триест, Италия, 2002), V Всероссийской научной конференции "Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия" (Астрахань, 2002), XI Международном симпозиуме "Эколого-физиологические проблемы адаптации" (Москва, 2003), VI Всероссийской научной конференции "Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия" (Астрахань, 2003), VII Всероссийской научной конференции "Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия" (Астрахань, 2004) и научно-методических конференциях профессорско-преподавательского состава АГТУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ.

Объем и структура работы. Диссертация представлена на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 рисунками и 3 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 3^х глав с изложением собственных результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, указателя цитируемой литературы. Список литературы включает 226 источника, в том числе 135 работ отечественных и 91 работ иностранных авторов.

Материал и методы исследования

Работа выполнена в течение 2001-2004 годов в лабораторных условиях. В работе были исследованы половозрелые особи белуги (*Huso huso* L.), русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt), севрюги (*Acipenser stellatus* Pallas), щуки (*Esox lucius* L.), белого амура (*Ctenopharyngodon idella* Valenciennes), леща (*Abramis brama* L.), сазана (*Cyprinus carpio* L.), карася (*Carassius carassius* L.), белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes), окуня (*Perca fluviatilis* L.), ерша (*Gymnocephalus cernua* L.) и берша (*Stizostedion volgensis* Gmelin).

Эксперименты проводились в условиях *in vitro*. Определение уровня активности мальтазы проводили глюкозооксидазным методом (Балаховский, 1987), уровня активности нейтральной протеиназы — модифицированным методом Лоури (Алейникова, Рубцова. 1988), уровня активности щелочной фосфатазы - по степени гидролиза паранитрофенилфосфата Na.

В ходе выполнения работы использовали следующие методические подходы:

1. Действие ионов металлов на уровень активности ферментов.

В качестве источников ионов металлов использовали соответствующие сернокислые соли ($MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$). Растворы этих солей добавлялись в ферментативно активный препарат и субстрат в количестве, необходимом для создания в этих средах концентрации соответствующего иона в 10 мг/л.

2. Действие моносахаридов и аминокислот на уровень активности ферментов. В качестве моносахаридов использовали - 10 mM растворы глюкозы, фруктозы и смесь глюкозы и фруктозы с концентрацией каждого из модификаторов в 5 mM, в качестве аминокислот использовали - 10 mM растворы глицина, L-глутамина, L-лейцина, DL-Р-фенил- α -аланина. Модификаторы добавлялись в ферментативно активный препарат и раствор субстрата непосредственно перед началом инкубации.

3. Действие различных субстратов на уровень активности ферментов. Сопоставляли скорость гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника рыб 2% раствора мальтозы, 1% раствора казеина и 0,6 mM раствора п-нитрофенилфосфата Na по отдельности и в присутствии одного или двух веществ являющихся субстратом при определении уровня активности мальтазы, суммарной протеиназы и щелочной фосфатазы. Гомогенаты слизистой оболочки кишечника приготавливали по отдельности. Модификаторы добавляли непосредственно

венно к субстрату перед инкубацией его с ферментативно активным препаратом.

Результаты обрабатывались методами вариационной статистики (Закс, 1976; Лакин, 1990). Достоверность различий определялась с помощью критериев Стьюдента. Основная часть статистической обработки выполнена с использованием пакета статистической обработки информации STATGRAPHICS.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Сопоставление интенсивности гидролиза казеина и мальтозы в слизистой оболочке кишечника рыб, относящихся к различным экологическим и систематическим группам

В ряде работ было отмечено, что у рыб, относящихся по типу питания к разным экологическим группам, характеристики одноименных ферментов различны (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003). В наших экспериментах уровень активности суммарной протеиназы был статистически достоверно выше ($p < 0,001$) у хищных рыб по сравнению с мирными (рис. 1), а мальтазы напротив, у мирных был больше, чем у хищных (рис. 2).

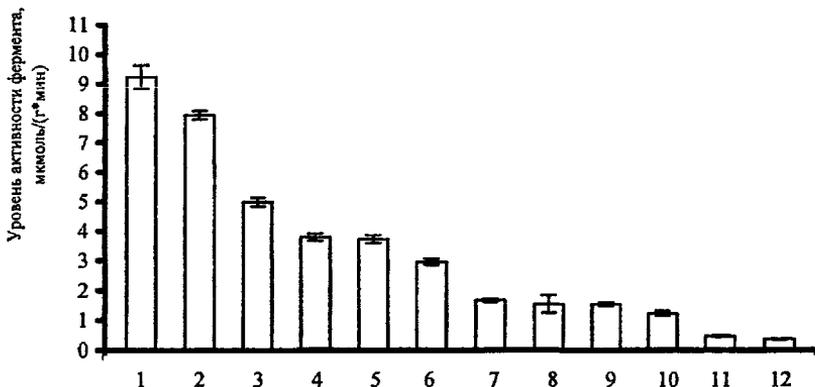


Рис. 1. Уровень активности суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника берша (1), ерша (2), щуки (3), окуня (4), белуги (5), русского осетра (6), карпа (7), карася (8), леща (9), севрюги (10), белого толстолобика (11) и белого амура (12).

Так, по убыванию уровня активности суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника исследованные виды рыб можно расположить в ряд: берш → ерш → щука → окунь → белуга → русский осетр → карп → карась → лещ → севрюга → белый толстолобик → белый амур, а по убыванию мальтазной активности: карп → белый амур → карась → лещ → белый толстолобик → щука → севрюга → белуга → русский осетр → окунь → ерш → берш. Данные полученные нами продемонстрировали также, что уровень активности одноименных ферментов у различных видов может отличаться на порядок. К примеру, уровень активности суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника берша составил $9,29 \pm 0,39$ мкмоль/(гхмин), а у белого амура $0,37 \pm 0,02$ мкмоль/(гхмин); уровень активности мальтазы у карпа составляет $14,30 \pm 0,63$ мкмоль/(гхмин), а у берша $2,14 \pm 0,15$ мкмоль/(гхмин).

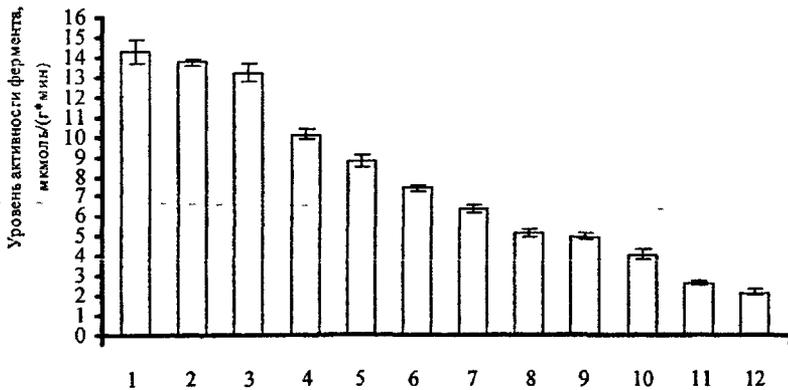


Рис. 2. Уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника карпа (1), белого амура (2), карася (3), леща (4), белого толстолобика (5), щуки (6), севрюги (7), белуги (8), русского осетра (9), окуня (10), ерша (11) и берша (12).

2. Влияние ионов металлов на уровень активности пищеварительных ферментов

Данные, полученные при исследовании влияния ионов металлов в концентрации 10 мг/л на уровень активности щелочной фосфатазы,

мальтазы и суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника рыб представлены в таблице 1.

Установлено, что ионы металлов оказывают разнонаправленное влияние на уровень активности исследованных ферментов слизистой оболочки кишечника рыб. В частности уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника зависит не только от того, какой металл находится в инкубационной среде, но и от систематического положения исследуемых рыб. Так, например, Mn^{2+} повышает уровень активности щелочной фосфатазы от 80 до 115%, Fe^{2+} и Co^{2+} активируют фермент от 25 до 80%, Cu^{2+} и Zn^{2+} напротив вызывают ингибирование уровня активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб от 10 до 60% в зависимости от вида рыбы.

Fe^{2+} и Co^{2+} вызывают статистически достоверные изменения в уровне активности суммарной протеиназы карповых видов рыб, в то время как у осетровых (севрюга) данные металлы не вызывают статистически значимых изменений в уровне активности суммарной протеиназы. Это может быть объяснено, скорее всего, существенными различиями в строении полипептидных цепочек ферментов у представителей семейств Acipenseridae и Cyprinidae.

А.М. Уголевым (Уголев и др., 1983) было высказано предположение о существовании не одного, а нескольких регуляторных центров в молекулах пищеварительных ферментов специализированных для различных групп эффекторов. По мнению ряда исследователей (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2001 и др.) быстрые конформационные переходы одной формы молекулы фермента в другую, приводящие к изменению уровня их активности, могут происходить в результате действия модификаторов как органической, так и неорганической природы.

Еще один возможный механизм взаимодействия металла с молекулой фермента, вероятно, заключается в связывании иона металла со специальной контактной площадкой (регуляторный или аллостерический центр), пространственно отделенной от активного центра (Monod et al., 1963, 1965; Уголев, 1972) с замещением металлокомпонента некоторых энзимов (пептидазы, щелочная фосфатаза) на металл, близкий по атомному строению. Так, ионы ряда металлов, например, марганца, кобальта, цинка, способны активно подменять ионы других металлов, в частности магний, в ряде энзиматических систем (Калоус, Павличек, 1985).

Таблица 1

Влияние ионов металлов на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника рыб

Виды	Ферменты	Уровень активности ферментов, мкмоль/(г×мин)						
		Контроль	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
Севрюга	Щелочная фосфатазы	0,28±0,01	0,59±0,02	0,49±0,01	0,40±0,01	0,40±0,01	0,15±0,01	0,25±0,01
	Мальтаза	5,00±0,15	6,34±0,28	5,23±0,24	5,61±0,40	5,13±0,25	3,79±0,10	3,18±0,05
	Суммарная протеиназа	0,26±0,03	0,44±0,05	0,43±0,02	0,34±0,01	0,27±0,04	0,190,01	0,29±0,02
Белый амур	Щелочная фосфатазы	0,71±0,03	1,29±0,07	0,98±0,06	0,83±0,02	0,75±0,03	0,57±0,02	0,60±0,02
	Мальтаза	4,23±0,15	5,48±0,21	4,99±0,18	5,32±0,17	4,37±0,11	2,49±0,09	3,25±0,11
	Суммарная протеиназа	0,63±0,04	0,82±0,06	0,77±0,03	0,74±0,04	0,60±0,02	0,47±0,03	0,55±0,02
Карп	Щелочная фосфатазы	0,18±0,01	0,39±0,02	0,33±0,02	0,23±0,01	0,23±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01
	Мальтаза	4,34±0,13	5,41±0,18	5,07±0,11	4,98±0,17	4,41±0,07	3,21±0,15	3,72±0,11
	Суммарная протеиназа	0,42±0,03	0,68±0,02	0,54±0,03	0,51±0,02	0,45±0,03	0,32±0,02	0,35±0,03
Карась	Щелочная фосфатазы	0,27±0,01	0,48±0,02	0,44±0,02	0,36±0,02	0,30±0,01	0,10±0,01	0,19±0,01
	Мальтаза	3,48±0,21	5,01±0,37	4,91±0,25	4,27±0,19	3,71±0,24	2,18±0,11	2,96±0,17
	Суммарная протеиназа	0,74±0,05	1,03±0,06	0,97±0,07	0,83±0,04	0,79±0,03	0,59±0,03	0,65±0,02
Белый толстолобик	Щелочная фосфатазы	0,61±0,02	1,30±0,03	0,75±0,02	0,76±0,03	0,55±0,02	0,47±0,03	0,56±0,01
	Мальтаза	6,61±0,14	8,42±0,12	8,49±0,21	7,63±0,07	6,96±0,14	5,91±0,14	6,14±0,14
	Суммарная протеиназа	1,25±0,06	1,37±0,05	1,32±0,06	1,33±0,07	1,20±0,05	0,85±0,05	1,01±0,06

Скорее всего, первый способ взаимодействия ионов металлов с ферментом лежит в основе изменения гидролитической активности такой исследуемой группы ферментов, как суммарная протеиназа и мальтаза. А взаимодействия второго типа характерны для щелочной фосфатазы. Однако не исключено, что в ряде случаев мы имеем дело с эффектом положительной кооперативности, оказываемым ионами металлов, когда в результате взаимодействия олигомерной глобулы фермента с ионом металла увеличивается сродство фермента к субстрату. Следствием этого становится возросшая эффективность образования продукта реакции (Диксон, Уэбб, 1982; Плакунов, 2001).

Приведенные выше данные, свидетельствующие о наличии межвидовых отличий в уровне ответной реакции пищеварительных ферментов на присутствие ионов металлов в инкубационной среде у представителей сем. *Acipenseridae* и *Syngnidae*, свидетельствуют о том, что в отличие от каталитических центров ферментов, регуляторные имеют существенные отличия у осетровых рыб от таковых у карповых рыб. Вероятно, это может быть объяснено предположением В.В. Кузьминой (1997) о том, что в процессе эволюции каталитические центры ферментов изменяются в меньшей степени, чем регуляторные.

Еще А.В. Войнаром (1960) была отмечена зависимость ответной реакции ферментов на действие ионов металлов в соответствии с их положением в периодической таблице химических элементов Д.И. Менделеева. В наших экспериментах была продемонстрирована зависимость ответной реакции щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб от положения находящегося в инкубационном растворе металла в таблице химических элементов Д.И. Менделеева. В частности, установлено, что в ряду металлов IV периода вспомогательных групп Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} максимальное влияние оказывают металлы, находящиеся в начале и конце ряда. Причем, перечисленные металлы, находящиеся в начале периода оказывают стимулирующее действие на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб, а в конце - угнетающее. Данная зависимость для мальтазы и суммарной протеиназы прослеживается в меньшей степени.

Приведенные результаты демонстрируют регуляторную функцию ионов металлов, выступающих в качестве модификаторов ферментов гидролитических систем как осетровых, так и карповых видов рыб. Исходя, из приведенных фактов следует, что, варьируя концентрацию микроэлементов, входящих в составе премиксов в искусст-

венные корма, возможно стимулирование процесса усвоения углеводных или белковых компонентов пищи у выращиваемых видов рыб.

3. Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности пищеварительных ферментов рыб

Результаты экспериментов по исследованию влияния углеводов и аминокислот на уровень активности пищеварительных ферментов рыб представлены в таблице 2. Как видно из представленных данных, продукты гидролиза мальтозы существенно подавляют уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника у всех исследованных видов рыб. При чем, данное подавление было выражено весьма существенно и, в зависимости от вида рыбы, составило от 30 до 80%. Аминокислоты приводили к увеличению скорости гидролиза мальтозы или же не вызвали статистически достоверных изменений в скорости указанного процесса. Так, например, уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника русского осетра и белого амура составил $5,36 \pm 0,17$ и $4,99 \pm 0,12$ мкмоль/(гхмин) соответственно, а в присутствие глюкозы в инкубационной среде уровень активности данного фермента снизился соответственно до $2,03 \pm 0,11$ и $1,75 \pm 0,12$ мкмоль/(гхмин). Глицин, L-глутамин, L-лейцин и DL-β-фенил-α-аланин вызывают активацию уровня активности мальтазы слизистой оболочки берша до $2,63 \pm 0,12$, $3,22 \pm 0,12$, $3,52 \pm 0,10$ и $3,82 \pm 0,09$ мкмоль/(гхмин) соответственно против $1,57 \pm 0,08$ мкмоль/(гхмин) в контроле.

В действии модификаторов углеводной и белковой природы на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб нам не удалось выявить каких либо видимых закономерностей и здесь, по-видимому, в основе ответной реакции фермента на присутствие модификатора лежат, скорее всего, видовые особенности исследуемых видов рыб. Так, при исследовании взаимодействия модификаторов с ферментами группы суммарной протеиназы установлена зависимость от систематического положения исследуемых видов рыб. В частности, ни один из исследованных модификаторов не вызывал статистически достоверных изменений в уровне активности данного фермента у представителей сем. *Acipenseridae*. У представителей сем. *Syringidae* модификаторы углеводной природы, как правило, приводили к снижению скорости гидролиза казеина в слизистой оболочке кишечника, а аминокислоты не вызывали статистически достоверных изменений в уровне активности суммарной протеиназы.

Таблица 2

Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника рыб

Виды	Ферменты	Уровень активности ферментов, мкмоль/(г×мин)							
		Контроль	Глюкоза	Фруктоза	Глюкоза + Фруктоза	Глицин	L-глутамин	L-лейцин	DL-β-фенил-α-аланин
Русский осетр	Щелочная фосфатазы	1,44±0,01	1,45±0,02	1,43±0,01	1,40±0,03	1,430±,02	1,49±0,02	1,57±0,02	1,54±0,01
	Мальтаза	5,36±0,17	2,03±0,01	5,40±0,19	3,24±0,14	5,59±0,11	5,78±0,23	5,97±0,13	6,23±0,27
	Суммарная протеиназа	2,44±0,11	2,43±0,12	2,38±0,09	2,37±0,10	2,48±0,11	2,41±0,10	2,51±0,16	2,43±0,10
Белый амур	Щелочная фосфатазы	0,600,01	0,62±0,01	0,58±0,01	0,60±0,02	0,60±0,01	0,61±0,01	0,60±0,01	0,69±0,04
	Мальтаза	4,99±0,29	1,75±0,12	4,86±0,16	1,65±0,15	4,93±0,11	4,84±0,22	5,44±0,22	4,67±0,39
	Суммарная протеиназа	0,62±0,07	0,61±0,07	0,51±0,03	0,51±0,02	0,75±0,09	0,52±0,02	0,58±0,03	0,63±0,03
Лещ	Щелочная фосфатазы	0,96±0,01	0,85±0,03	0,84±0,01	0,87±0,01	1,15±0,02	0,86±0,01	0,89±0,02	1,06±0,03
	Мальтаза	2,55±0,20	0,48±0,10	2,950,20	0,85±0,14	2,56±0,19	2,76±0,16	3,13±0,19	3,27±0,12
	Суммарная протеиназа	1,08±0,09	0,84±0,06	0,87±0,06	0,75±0,02	0,85±0,05	1,05±0,02	1,06±0,04	1,05±0,06
Окунь	Щелочная фосфатазы	1,02±0,01	0,93±0,01	0,90±0,01	0,93±0,01	0,92±0,01	0,90±0,02	0,89±0,02	0,88±0,01
	Мальтаза	4,47±0,16	1,09±0,11	4,88±0,22	2,03±0,19	5,56±0,12	6,10±0,16	6,76±0,13	7,24±0,15
	Суммарная протеиназа	2,10±0,09	1,85±0,10	1,84±0,05	1,99±0,14	2,05±0,06	1,87±0,06	1,83±0,07	1,87±0,06
Берш	Щелочная фосфатазы	1,79±0,04	1,68±0,03	1,70±0,03	1,72±0,04	1,63±0,02	1,70±0,01	1,82±0,03	1,76±0,04
	Мальтаза	1,57±0,08	0,53±0,05	1,73±0,09	1,13±0,09	2,63±0,20	3,220,12	3,52±0,10	3,82±0,09
	Суммарная протеиназа	2,80±0,07	2,55±0,09	2,66±0,06	2,43±0,07	2,43±0,11	2,71±0,10	2,78±0,12	2,69±0,15

Таким образом, как было уже указано выше, можно предположить, что каталитические центры фермента в процессе эволюции изменяются в меньшей степени, нежели регуляторные.

Ранее было установлено, что конечные продукты гидролиза крахмала способны изменить скорость гидролиза данного биополимера под действием α -амилазы, кроме того продемонстрировано, что модификационный эффект зависит не только от природы вещества модификатора, но и от видовой принадлежности объекта исследования (Неваленный и др., 2003). Подобные результаты были также получены Де Лейем (De Laye, 1966) и Еггермонтом (Eggermont, 1968) на крысах.

Для того, чтобы объяснить полученные нами данные необходимо обратиться к основным представлениям теории регуляции ферментативной активности. Так, по современным представлениям, регуляция на уровне ферментативной активности осуществляется с помощью одного из трех механизмов: 1) изостерического; 2) аллостерического 3) гомостерического (Уголев, 1972; Уголев, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Плакунов, 2001; Неваленный и др., 2003).

В случае с достоверным ингибирующим действием глюкозы на уровень активности мальтазы у всех исследованных нами видов рыб мы, скорее всего, имеем дело с изостерическим эффектом, поскольку продукт реакции является структурным аналогом субстрата, вследствие чего может присоединяться к активному центру фермента и вызывать ингибирование конкурентного типа (Уголев, 1972). Данное явление ретроингибирования впервые было описано Новиком и Сцилардом (Novic, Szilard, 1954) и Умбаргером (Umbarger, 1956; Умбаргер, 1954), показавшим, что в цепи ферментативных реакций конечный продукт нередко является ингибитором фермента, катализирующего начальный этап процесса. В результате этого возникает отрицательная обратная связь, поддерживающая постоянство скоростей реакций, которые обеспечиваются данной ферментативной цепью (гоморезис).

Следует отметить, что присутствие аминокислот в инкубационной среде в большинстве случаев привело к статистически достоверному ($p < 0,01$) увеличению уровня активности мальтазы слизистой оболочки кишечника рыб, причем L-лейцин и **DL- β -фенил- α -аланин** активировали уровень активности данного фермента у всех исследованных нами видов рыб. Обращает на себя внимание тот факт, что максимальное положительное действие субстратов-регуляторов (аминокислот) наблюдалось у хищных видов рыб (окунь, берш). Так суб-

страт-регулятор (модификатор) осуществляет изменение ферментативной активности, не являясь субстратом соответствующего фермента и регуляция осуществляется за счет связывания модификатора в пункте пространственно не совпадающем с активным центром (Уголев, 1972, 1985). К примеру уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника окуня в контроле составил $4,77 \pm 0,16$ мкмоль/(гхмин), а при действии глицина, L-глутамина, L-лейцина и **DL-β-фенил-α-аланина** увеличился на 17, 28, 41 и 51% соответственно. В то время как у леща глицин и L-глутамин не привели к достоверным изменениям в уровне активности мальтазы, а L-лейцин и **DL-β-фенил-α-аланин** активировали уровень активности данного фермента на 22 и 28% соответственно.

Механизм действия исследованных нами модификаторов на уровень активности щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника рыб является также аллостерическим. Однако углеводы и аминокислоты могут выступать в роли как активатора, так и неконкурентного ингибитора. Например, глюкоза ингибирует уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника леща до $0,85 \pm 0,03$ мкмоль/(гхмин) против **$0,96 \pm 0,01$** мкмоль/(г х мин) в контроле, в то время как глицин, напротив, вызвал активацию данного фермента до $1,15 \pm 0,02$ мкмоль/(гхмин).

Из полученных нами данных видно, что модификационные взаимодействия могут вызывать существенные изменения в уровне активности ферментов слизистой оболочки кишечника рыб, тем самым осуществлять контроль метаболических процессов, как на уровне клетки, так и целого организма. Причем данная регуляция осуществляется очень быстро и не требует затрат энергии, что чрезвычайно важно для организма.

Кроме того, обращает на себя внимание разный характер влияния модификаторов на уровень активности ферментов у рыб разных видов. Ранее А.М. Уголевым и В.В. Кузьминой (1993) в экспериментах с трибутирином были выявлены различные эффекты модификатора у рыб, относящихся к различным систематическим и экологическим группам. В своей работе авторы не объяснили, чем обусловлены данные различия в ответной реакции ферментов на присутствие модификатора. В наших экспериментах было установлено, что у белого амура глицин вызвал статистически достоверное ($p < 0,01$) увеличение уровня активности суммарной протеиназы, в то время как у леща и карася напротив привел к достоверному ($p < 0,001$) ингибированию уровня активности данного фермента. Все эти три вида относятся к

одному семейству Cyprinidae, а по типу питания белый амур является типичным растительноядным видом, в то время как карась и лещ относятся к группе бентофагов. Таким образом, с большей степенью вероятности можно сделать предположение о том, что ответная реакция фермента на присутствие того или иного субстрат-регулятора обусловлена как особенностями питания исследуемого вида, так и его таксономической принадлежностью.

При этом данные, полученные при исследовании влияния углеводов, аминокислот на уровень активности кишечной щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы демонстрируют идентичную реакцию ферментов на присутствие модификатора у всех исследованных нами представителей семейства Acipenseridae. По всей вероятности, это связано с тем, что пищеварительные ферменты у рыб данного семейства имеют близкую структуру регуляторных центров. Также интересно подчеркнуть, что эти же модификаторы у рыб, относящихся к другим семействам, могут вызвать противоположный эффект. Эти данные дают возможность сделать предположение, что у рыб разных таксономических групп структура регуляторных центров одноименных ферментов различна.

4. Взаимодействие пищевых веществ в процессе пищеварения в слизистой оболочке кишечника рыб

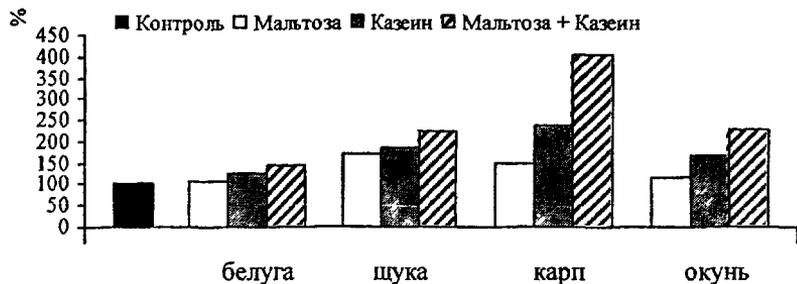
Одной из наиболее важных биологических закономерностей функционирования пищеварительной системы является ее тонкая приспособляемость к качеству пищи, обнаруженная еще на рубеже 19-20 веков в классических работах И.П. Павлова (1951). В последующих исследованиях данная закономерность получила дальнейшее подтверждение (Уголев, 1961, 1972, 1978, 1991; Шлыгин, 1967; Cogging, 1980; Уголев и др., 1986; Адаптационно-компенсаторные процессы..., 1991; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003 и др.). Необходимо отметить, что сущность пищевого или субстратного регулирования состоит в специфическом изменении структурных и функциональных характеристик кишечника, в том числе, ферментативной активности, в ответ на изменение состава пищи. При этом адаптивное изменение пищеварительной функции кишечника осуществляется как за счет регулирования численности энтероцитов, так и путем изменения их свойств (Уголев, 1972, 1978, 1991; Johnson, 1987; Уголев, и др., 1991; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003).

В реально протекающем гидролитическом процессе одновременно перевариваются белки, жиры и углеводы которые определенным образом влияют друг на друга, что было достаточно подробно исследовано у высших позвоночных животных (Уголев, 1972; Кушак, 1983). Имеются также отдельные сведения и о взаимодействии пищевых веществ в процессе гидролиза в кишечнике рыб (Кузьмина, 1997, Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 1996; Неваленный, Коростелев, 2002; Неваленный и др., 2003). Однако при исследовании полисубстратного пищеварения, как правило, пользуются простейшей моделью одновременного взаимодействия двух различных веществ. Для усложнения модели, нами были исследованы не только бисубстратные, но и трисубстратные взаимодействия веществ, являющимися субстратами при оценке основных ферментов слизистой оболочки кишечника рыб. Сопоставление интенсивности гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника рыб, относящихся к различным систематическим и экологическим группам, биополимера (казеина), дисахарида (мальтозы) и эфира фосфорной кислоты (п-нитрофенилфосфата Na) по отдельности и в присутствии одного или двух веществ позволило выявить эффекты взаимодействия субстратов ферментативных реакций. При этом важно отметить, что при исследовании бисубстратного взаимодействия одно и то же вещество может служить одновременно активатором для одного ферментативного процесса и ингибитором для другого (рис. 3). Однако крайне интересен тот факт, что эффекты трисубстратного пищеварения не являются суммой бисубстратных эффектов, более того они могут иметь противоположную направленность.

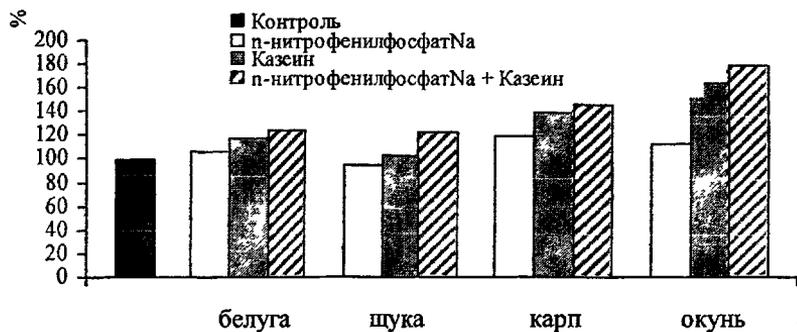
Важно подчеркнуть, что в наших экспериментах во всех случаях трисубстратных взаимодействий при исследовании основных ферментов слизистой оболочки кишечника всех исследованных нами видов рыб обнаружен только активирующий эффект. При этом исследовались ферменты как карбогидразного, так и протеиназного цикла в связи с этим, полученные данные можно с большей долей вероятности экстраполировать на процессы пищеварения, осуществляемые в кишечнике рыб в реальных условиях.

Еще И.П. Павлов (1951) высказал предположение о возможности взаимных влияний, возникающих при переваривании различных пищевых веществ, которое подтвердилось только после открытия в 50-х годах 20 века механизма мембранного пищеварения (Уголев, 1961, 1972), так как именно благодаря ему происходит взаимодействие между различными компонентами пищи, а, кроме того, не суще-

A



Б



B

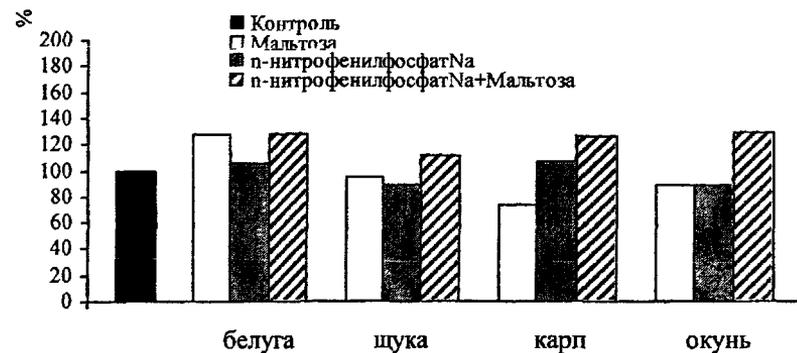


Рис. 3. Уровень активности щелочной фосфатазы (А), мальтазы (Б) и суммарной протеиназы (В) слизистой оболочки кишечника рыб в присутствии различных субстратов.

Обозначения: по вертикали - уровень активности фермента в процентах от контроля принятого за 100%.

твовало сколько-нибудь удовлетворительной теории, объясняющей механизм действия и регуляции ферментативных процессов.

При исследовании высших позвоночных животных было установлено существование сложной системы взаимодействия пищевых веществ в процессе мембранного гидролиза. В частности, показано, что если в пищеварительный канал одновременно поступают жиры, белки и углеводы, сначала перевариваются жиры, затем углеводы и, наконец, белки. При моносубстратных процессах с наибольшей скоростью перевариваются белки, а наиболее медленно - жиры. Кроме того, в присутствии жиров имеет место смещение зоны гидролиза белков в дистальном направлении кишечника (Уголев, 1972; Ugolev et al., 1975).

Известно, что переваривание пищи является типичным ферментативным процессом. В связи с этим, данные об изменении хода гидролиза при одновременном присутствии в инкубационной среде нескольких субстратов, по сути дела, характеризуют изменения активности кишечных ферментов, или их регуляцию, под влиянием модификаторов. Следовательно, взаимодействие пищевых веществ в процессе мембранного пищеварения является регуляцией на уровне активности пищеварительных ферментов и может быть описано с помощью существующих в настоящее время теорий. Показано, что регуляция ферментативной активности осуществляется на двух уровнях. Первый, применительно к собственнокишечным ферментам, связан с процессом синтеза ферментативного белка и транслокацией его в мембрану энтероцита; регуляция второго типа происходит на основе уже существующих молекул белка и сопряжена с изменением их структуры (обзор: Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Кушак, 1983; Адаптивно-компенсаторные процессы..., 1991; Неваленный, 1996; Озернюк, Нечаев, 2002; Неваленный и др., 2003 и др.). Естественно, что в процессе полисубстратного пищеварения регуляция активности пищеварительных процессов не связана с синтезом белка, на который необходимо определенное время, а осуществляется практически мгновенно, иногда в доли секунды, за счет изменения активности ферментов в результате их связывания с тормозящим или стимулирующим субстратом-регулятором (модификатором).

Таким образом, установленные нами у рыб процессы ди- и три-субстратных взаимодействий имеют чрезвычайное значение для понимания механизма реализации пищеварительной функции у рыб. Они обеспечивают тесное сопряжение работы различных ферментативных цепей в кишечнике рыб, чем достигается определенный авто-

матизм в работе пищеварительной системы и настройка ее на соответствующий вид пищи. Следовательно, путем регуляции на уровне активности пищеварительных ферментов осуществляется определенная последовательность в обработке пищи и, по-видимому, интеграция пищеварительных и транспортных процессов.

Необходимо также отметить, что при исследовании 12 видов рыб, относящихся к различным таксономическим и экологическим группам, выявлены некоторые закономерности полисубстратных процессов, принципиально близкие описанным ранее для высших позвоночных животных (Уголев, 1972; Уголев и др., 1979; Кушак, 1983 и др.) и рыб (Хюттер и др., 1986; Кузьмина, 1987, 1991; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003). Так установлено, что мальтаза, щелочная фосфатаза и ферменты группы суммарной протеиназы обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у рыб, являются регулируемыми и способны изменять активность под действием различных компонентов пищевой смеси. Вместе с тем сопоставление в идентичных методических условиях влияния модификаторов различной природы на одноименные ферменты у рыб разных видов позволило выявить неоднозначность их эффектов.

Таким образом, у рыб и, вероятно, других пойкилотермных животных эффект модификаторов может значительно варьировать в силу большей гибкости макромолекул, входящих в состав фермент-мембранных комплексов, по сравнению с гомойтермными животными (Егорова и др., 1974; Александров, 1975; Уголев и др., 1976, 1981; Кузьмина, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный и др., 2003).

Полученные данные важны не только для понимания закономерностей мембранного пищеварения у рыб и других животных, но и имеют определенное значение для понимания механизма реализации пищеварительной функции *in situ*. Используемые в данной работе методические подходы могут оказаться полезными при исследовании темпов биохимической эволюции, причем характеристики регуляторных свойств ферментов, по-видимому, могут быть одним из инструментов биохимической систематики. Помимо этого, различие регуляторных свойств ферментов у рыб разных таксономических групп важно учитывать при составлении рационов искусственно разводимых рыб.

1. Продемонстрировано, что ферменты, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у рыб различных экологических и систематических групп, являются регулируемыми и способны изменять гидролитическую активность под действием различных веществ органической и неорганической природы.
2. Обнаружены видовые различия в уровне активности одноименных гидролаз в кишечнике исследованных видов рыб. Так показано, что хищные виды рыб имеют более высокий уровень активности ферментов комплекса суммарной протеиназы, тогда как мирные - мальтазы, что свидетельствует о наличии у рыб видовой адаптации пищеварительной системы к спектру питания.
3. При исследовании в условиях *in vitro* выявлено влияние ионов металлов (Mn, Fe, Co, Ni, Cu и Zn) на уровень активности пищеварительных гидролаз слизистой оболочки кишечника рыб, выражающееся в достоверном ($p < 0,05$) изменении уровня активности ферментов. Так, обратная реакция ферментов слизистой оболочки кишечника рыб под действием ионов металлов зависит от его положения в Периодической таблице химических элементов - максимальное активирующее влияние оказывают металлы, находящиеся в начале периода, а максимальное ингибирующее - в конце.
4. Выявлена идентичная реакция уровня активности пищеварительных ферментов на присутствие в инкубационной среде углеводов и аминокислот у представителей сем. *Acipenseridae*, свидетельствующая о том, что пищеварительные ферменты рыб данного семейства имеют близкую структуру регуляторных центров.
5. В результате исследований закономерностей взаимодействия продуктов гидролитических реакций с пищеварительными ферментами продемонстрировано явление ретроингибирования. Так, уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника различных видов рыб существенно уменьшается (от 30 до 80% в зависимости от вида рыб) в присутствии продуктов гидролиза мальтозы.
6. Выявлены процессы взаимодействия субстратов ферментативных реакций (мальтозы, казеина и п-нитрофенилфосфата

На) при исследовании ферментативных препаратов слизистой оболочки кишечника рыб. Продемонстрировано, что одно и то же вещество может служить одновременно активатором для одного ферментативного процесса и ингибитором для другого. Показано, что эффекты трехсубстратного пищеварения у рыб не являются суммой бисубстратных эффектов, при этом во всех случаях трисубстратных взаимодействий обнаружен только активирующий эффект.

7. При исследовании гидролитических процессов в кишечнике 12 видов рыб, относящихся к различным экологическим группам, установлено, что ответная реакция уровня активности пищеварительных ферментов зависит как от природы модификатора, находящегося в инкубационной среде, так и от систематического положения рыб. Это свидетельствует о существовании филогенетических и систематических адаптационных приспособлений пищеварительной системы рыб к условиям среды обитания.

Список публикаций по теме диссертации

1. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб // Моногр. - Астрахань: ФГОУ ВПО «Астрахан. гос. техн. ун-т», 2003. - 152 с. (А.Н. Неваленный, А.В. Туктаров)
2. Влияние некоторых металлов на уровень активности щелочной фосфатазы в слизистой кишечника рыб // Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного Прикаспия: Матер. 3 Всерос. научн. конф. -Астрахань: Изд-во Астраханского гос. пед. ун-та, 2000. -с. 170-171 (А.Н. Неваленный, А.В. Туктаров)
3. Воздействие некоторых микроэлементов на уровень активности щелочной фосфатазы и α -амилазы слизистой кишечника тарани // Вопросы рыболовства том 1. № 2-3. 2000, часть II. - с. 67-68 (А.Н. Неваленный)
4. Действие микроэлементов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов карпа // Межд. Научно-техн. конф. посв. 70-летию основания Калининградского гос. техн. ун-та, Часть IV, Калининград. 2000, -с. 298-299 (А.Н. Неваленный)

5. Динамика активности пищеварительных гидролаз карпа под действием ряда микроэлементов // Наука производству. №6 (44)/2001, -с. 24-26 (А.Н. Неваленный, А.В. Туктаров)
6. The influence of some metals' ions to alkaline phosphatase's active level of white sturgeon's mucus intestines *Huso huso* L. // Extended abstracts: 4 International symposium on sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA. 2001. PP119 (A.N. Nevalenny, A.V. Tuktarov)
7. Взаимодействие пищевых модификаторов с мембранно-связанными ферментами в кишечнике белуги и белорыбицы // Естественные науки. №5. Астрахань. Изд-во Астраханского гос. пед. ун-та, 2002, - с. 66-69 (А.Н. Неваленный)
8. Влияние модификаторов углеводной природы на процесс мембранного гидролиза у рыб // Эколого-биологические проблемы Волжского региона и Северного прикаспия: Матер. V Всерос. науч. конф. -Астрахань: Изд-во Астраханского гос. пед. ун-та, 2002. -с. 126-128 (А.Н. Неваленный)
9. Influence of some metals on the alkaline phosphatase activity of white sturgeon *Huso huso* L mucus intestine // Technical compendium to the proceeding of the 4th International Symposium on Sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA, Juli 8-13, 2001. Collection of Extended Abstracts and Presentation Summaries/ December 2002. P. 046 (A.N. Nevalenny, A.V. Tuktarov)
10. Влияние аминокислот на мембранный гидролиз углеводов и эфира фосфорной кислоты у рыб // Материалы XI межд. Симпоз. "Эколого-физиологические проблемы адаптации". М.: Изд-во РУДН, 2003. -с. 56-57
11. The regulations of in the carp's intestines in presence of some microelements // International conference „Aquaculture Europe 2002”, Trieste. Italy. October 19-19. - P. 374-376 (A.N. Nevalenny, A.V. Tuktarov)
12. Digestive enzymes activity level changes of the sturgeon fishes under the influence of microelements // International conference „Aquaculture Europe 2002”, Trieste. Italy. October 19-19. - P. 377-378 (A.N. Nevalenny, A.V. Tukrarov, R.I. Aljanov)
13. The influence of some metals on digestive processes of sturgeons // International conference „Aquaculture Europe 2001” New species. New technologies. - P. 192 (A.N. Nevalenny, A.V. Tuktarov, R.I. Aljanov)

14. Исследование полисубстратного пищеварения у белого толстолобика и белого амура в условиях *in vitro* // Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: Матер. VI Межд. научн. конференции: -Астрахань Изд-во Астраханского гос. ун-та, 2003. -с. 110-112 (А.Н. Неваленный)
15. Модификационное регулирование уровня активности мальтазы у рыб сем. *Acipenseridae* и *Suprinidae* // Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: Матер. VII Межд. научн. конф: -Астрахань: Изд-во Астраханского гос. ун-та, 2004. -с. 99-100 (А.Н. Неваленный)