

*на правах рукописи*



**КОРОСТЕЛЁВ СЕРГЕЙ ГЕОРГИЕВИЧ**

**ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ  
РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ  
ГРУПП**

Специальность: 03.00.13. - физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Астрахань – 2006

Работа выполнена в Камчатском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО)

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор

А.Н. Невалённый

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

Ю.В. Алтуфьев

доктор биологических наук

А.С. Васильев

доктор биологических наук, профессор

А.Ф. Сокольский

**Ведущая организация:**

Камчатский государственный технический университет

Защита диссертации состоится 10 февраля 2006 г. в 12 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 «6» января 2006 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Ю.В. Нестеров

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Полученная в течение второй половины XX века информация значительно изменила многие наиболее фундаментальные представления о работе пищеварительной системы. Традиционные взгляды на механизм ассимиляции пищевых веществ гетеротрофными организмами основывались на общепринятом представлении о существовании двух типов пищеварения – внеклеточного и внутриклеточного. Однако в конце 50-х годов было обнаружено (Уголев, 1960-а; б), что помимо упомянутых выше классических типов пищеварения существует третий фундаментальный тип – мембранное пищеварение, которое осуществляется при контакте пищевых субстратов с ферментами, локализованными на внешней поверхности структур кишечных клеток. В этот же период описаны наиболее существенные особенности мембранного пищеварения. Обнаружение последнего позволило приблизиться к пониманию ряда важных закономерностей работы пищеварительного аппарата всех биотрофов.

Вместе с тем известно, что рыбы – это наиболее многочисленная группа позвоночных животных, насчитывающая более 20 тыс. видов с огромным разнообразием пищевых особенностей. В результате проведенных к настоящему времени исследований охарактеризованы закономерности полостного, мембранного и внутриклеточного гидролиза пищи и транспорта нутриентов в кишечнике рыб, достигнуты значительные успехи в изучении процессов индуцированного аутолиза и участия ферментов микрофлоры в реализации пищеварительной функции (Кузьмина, Цветкова, 2001; Кузьмина, Скворцова, 2001, 2002, 2003; Неваленный и др., 2003; Извекова, Лаптева, 2004 и мн. др.).

В конце XX века появились представления о том, что биосферу можно рассматривать, как трофосферу, где пищевые сети образуют замкнутую систему, функции обратной связи в которой играют ферменты, осуществляющие гидролитическое расщепление биополимеров (Уголев, 1985, 1990). Известно, что важнейшим биотическим фактором для гетеротрофных организмов является обеспеченность необходимой пищей, а наиболее важными абиотическими, особенно для холоднокровных гидробионтов – температура и для гидробионтов - концентрация водородных ионов в воде.

В связи с этим, особый интерес представляет исследование влияния экологических факторов на пищеварительную функцию кишечника рыб и выявление механизмов взаимодействия нутриентов в естественных условиях пищеварительного процесса. Следует отметить, что до последнего времени влияние температуры акклимации и реакции среды (рН) на активность энтеральных ферментов рыб практически не изучено, крайне мало

сведений о температурных адаптациях мембранных ферментов с учетом роли различных компонентов фермент-мембранных комплексов энтероцитов. Имеющиеся данные не позволяют сделать вывод о том, как влияют важнейшие абиотические факторы среды обитания на процессы пищеварения у рыб в течение жизненного цикла.

Несмотря на то, что регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб, были установлены достаточно давно (Гредин, 1977; Кузьмина 1987), механизмы взаимодействия пищевых веществ в процессе гидролиза остаются до конца не выясненными (Неваленный и др., 2003). Сведения, полученные при исследовании этих вопросов, необходимы для решения не только ряда теоретических и прикладных проблем питания и пищеварения рыб, но также и для понимания процессов, происходящих в водных экосистемах.

**Цель и задачи исследований.** Основная цель работы заключалась в изучении особенностей усвоения пищи у рыб различных таксономических и экологических групп. Центральное внимание было уделено влиянию температуры и концентрации ионов водорода на процессы мембранного пищеварения и процессам взаимодействия пищевых веществ в кишечнике рыб.

В связи с этим, были поставлены следующие задачи:

Исследовать видовые температурные адаптации пищеварительных ферментов рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы.

Выявить индивидуальные температурные адаптации на примере мембраносвязанной мальтазы карпа.

Оценить влияние температуры среды содержания и функционального состояния карпов на структурные характеристики их кишечников.

Сравнить физико-химические свойства мембранной, детергентной и протеазной форм кишечной мальтазы различных карповых рыб.

Проанализировать влияние концентрации водородных ионов в воде на активность гидролитических ферментов рыб в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Изучить влияние состава потребляемой пищи на активность пищеварительных ферментов и установить эффекты взаимодействия пищевых веществ в процессе гидролиза у рыб различных таксономических групп.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Выявлены особенности ферментных систем, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб разных таксономических групп (осетровые, лососевые, карповые, камбаловые), обитающих в холодных водах и у видов из южных водоемов, а также у пресноводных, морских и

проходных экологических групп. При этом показано, что свойства пищеварительных ферментов у исследованных групп видов рыб свидетельствуют об их значительной адаптированности к условиям функционирования, что обеспечивает оптимальное осуществление пищеварительной функции в естественных условиях.

Впервые при акклимации рыб к разным температурам проведено одновременное исследование как весовых и линейных характеристик кишечника, так и активности, и свойств ферментов клеток слизистой оболочки кишечника карпов. Установлено, что изменение температуры акклимации в диапазоне 8-28°C не вызывает адаптивных сдвигов в уровне активности и свойствах ферментов, осуществляющих мембранный гидролиз углеводов в кишечнике. Высказана гипотеза, что гомеостаз мембранного пищеварения при изменении температуры акклимации поддерживается не за счет регуляции активности и свойств кишечных ферментов, а за счет изменения массы слизистой оболочки кишечника. При понижении температуры она увеличивается, а при повышении – уменьшается. По-видимому, этот механизм особенно важен для сезонных адаптаций пищеварительной системы рыб.

Впервые на основе исследования физико-химических свойств мембраной, детергентной и протеазной форм кишечной мальтазы карповых рыб установлены видовые различия фермент-мембранного комплекса, а также внутривидовые особенности у карпов украинской и ропшинской породных групп, которые исчезают при разрушении комплекса фермент-мембрана. Выявленные различия свидетельствуют о фенотипических температурных адаптациях ферментных систем кишечника рыб, которые осуществляются за счет изменения микросреды – свойств клеточной мембраны и гидрофобного домена, но не затрагивают структуру белковой глобулы фермента. Кроме того, показано, что амфипатические ферменты холоднокровных животных менее прочно связаны с мембранами несущих их клеток, по сравнению с ферментами теплокровных.

В экспериментах по влиянию различных концентраций водородных ионов в среде содержания карпов на активность мембранных ферментов показан S-образный характер зависимости активности карбогидраз при увеличении концентрации водородных ионов в воде с минимумом при pH 5-6 и максимумом при pH 4. В результате сопоставления pH-функций, полученных для пищеварительных ферментов лососевых рыб, обитающих в водоемах Камчатки, отмечена более широкая зона оптимальных значений pH, по сравнению с пресноводными костистыми рыбами умеренных широт.

При исследовании ферментативно активных препаратов слизистой кишечника осетровых, лососевых, карповых и камбаловых видов рыб выявлены процессы

взаимодействия субстратов ферментативных реакций в условиях *in vitro* для всех исследованных групп пищевых веществ. Установлено, что во всех случаях трисубстратных взаимодействий при исследовании слизистой кишечника рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, обитающих как в пресной, так и в морской среде, а также у проходных видов рыб обнаружен только активирующий эффект.

В целом, анализ собственных и литературных данных позволил сделать заключение о том, что у рыб, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы, но близких по характеру питания, наблюдается сходное соотношение состава и активности мембранных гидролаз, а у рыб таксономически близких, различающихся по экологии, напротив, отмечаются значительные различия.

Результаты диссертации имеют и практический интерес. Установленные в работе закономерности позволяют рекомендовать при разработке кормов для выращиваемых видов рыб очень точную сбалансированность по содержанию основных групп пищевых веществ, характерному для пищи вида в естественных условиях, чтобы обеспечить максимальную эффективность гидролитического процесса. Полученные данные необходимо учитывать при исследованиях болезней рыб и нарушений пищеварения, как в естественных условиях, так и в аквакультуре.

Установленные факты могут быть использованы для оптимизации условий выращивания рыб и при проведении селекционной работы. В частности, данные по влиянию температуры и реакции среды на активность пищеварительных ферментов необходимо использовать для расчета норм кормления выращиваемых рыб в зависимости от температуры и pH воды или для искусственного поддержания этих факторов на оптимальном уровне. При селекции рыб и выборе объектов выращивания для различных климатических зон рыбоводства необходимо учитывать выявленные в диссертации температурные адаптации ферментов мембранного пищеварения.

Результаты работы могут быть включены в курсы лекций при подготовке специалистов: ихтиологов, гидробиологов и экологов. Некоторые данные уже включены в лекции по экологии и трофологии, читаемых для студентов в ряде университетов.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и представлялись на Всесоюзной конференции «Механизмы регуляции физиологических функций» (Ленинград, 1988), 4-ой Всесоюзной конференции по раннему онтогенезу (Москва, 1988), 1-ой Всесоюзной конференции по рыбохозяйственной токсикологии (Рига, 1989), 7-ой и 8-ой Всесоюзных конференциях по экологической физиологии и биохимии рыб (Ярославль, 1989; Петрозаводск, 1992), 4-ом Всесоюзном симпозиуме «Мембрана щеточной каймы» (Рига,

1990), Всесоюзной конференции «Оценка состояния, охрана и рациональное использование биологических ресурсов водных экосистем в условиях антропогенного воздействия» (Ростов-на-Дону, 1990), 15-ой Всесоюзной конференции «Физиология пищеварения и всасывания» (Краснодар, 1990), 4-ой Всесоюзной конференции по рыбохозяйственному использованию теплых вод (Курчатов, 1990), заседании методсовета «Корма, кормление и кормопроизводство для рыб» НЦ «Аквакультура» НПО по рыбоводству (Рыбное, 1991), Международной конференции «Каспий – настоящее и будущее» (Астрахань, 1995), 1-ом Конгрессе ихтиологов России (Астрахань, 1997), 3 International symposium on sturgeon (Piacenza, 1997), Международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2004).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 45 работ.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 276 страницах машинописного текста, иллюстрирована 63 рисунками, содержит 11 таблиц, состоит из введения, 5 глав, общего заключения, выводов и указателя цитируемой литературы, который включает 425 работ, в том числе 292 отечественных и 133 иностранных авторов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследований для выявления особенностей мембранного пищеварения у рыб были выбраны представители таксономических групп, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, обитающие в разных экологических условиях (осетровые – *Acipenseridae*, лососевые – *Salmonidae*, карповые – *Cyprinidae* и камбаловые – *Pleuronectidae*). Всего исследовано 904 экз. рыб, выполнено 426 опытов и 41298 биохимических определений.

Для изучения активности и свойств ферментов, обеспечивающих мембранное пищеварение, использовали гомогенаты слизистой оболочки кишечника. Солюбилизованные ферменты получали по следующей схеме. После размораживания слизистой оболочки ее гомогенизировали в охлажденном растворе Рингера в соотношении 1:9 и центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g (при этом основная ферментативная активность наблюдалась в надосадочной жидкости). Детергентную и протеазную формы мальтазы получали как супернатант после обработки надосадочной жидкости при температуре 25°C в течение 20 мин неполярным детергентом тритоном-X-100 (1 мл на 100 мл препарата) или трипсином (1 мг на 1 мл препарата) при температуре 37°C в течение 30 мин и последующего ультрацентрифугирования при 100000 g в течение 30 мин. Мембранная

форма мальтазы находилась в осадке после ультрацентрифугирования препарата без предварительной обработки солубилизирующими агентами.

Исследование влияния температуры инкубации на скорость ферментативных реакций проводили в диапазоне температур 0-75°C в течение коротких интервалов времени (5-10 мин) в специальном политермостате (Варламов и др., 1971).

Активность мальтазы определяли при помощи глюкозооксидазного метода (Dahlqvist, 1964), сахаразную и суммарную карбогидразную активность – методом Нельсона в модификации А.М. Уголева и Н.Н. Иезуитовой (1969), активность  $\alpha$ -амилазы - по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя (Уголев, 1969), суммарную протеиназную (рН 7.4) - модифицированным методом Лоури (Алейникова, Рубцова, 1988), активность щелочной фосфатазы с использованием 0,6 мМ раствора п-нитрофенилфосфата Na в качестве субстрата.

Для исследования полисубстратных эффектов сопоставляли скорость гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника рыб 1% раствора растворимого крахмала, 2% раствора мальтозы, 1% раствора казеина и 0,6 мМ раствора п-нитрофенилфосфата Na по отдельности и в присутствии одного или двух веществ являющихся субстратом при определении уровня активности комплекса карбогидраз, мальтазы, суммарной протеиназы и щелочной фосфатазы. Гомогенаты слизистой оболочки кишечника приготавливали по отдельности. Модификаторы добавляли непосредственно к субстрату перед инкубацией его с ферментативно активным препаратом.

Активность фермента выражали в мг или мкмоль продуктов гидролиза, образующихся за 1 мин инкубации в расчете на 1 г влажного веса слизистой кишечника (мг или мкмоль  $\times$  г<sup>-1</sup>  $\times$  мин<sup>-1</sup>).

Энергию активации рассчитывали по формуле (1):

$$E_{\text{акт}} = R \times T_2 \times T_1 \times (\text{Lg } V_2 - \text{Lg } V_1) / (T_2 - T_1), \quad (1)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T<sub>2</sub> и T<sub>1</sub> – величина обратная абсолютной температуре (K<sup>-1</sup>  $\times$  10<sup>3</sup>) инкубации, а V<sub>2</sub> и V<sub>1</sub> – скорости ферментативной реакции при разных температурах.

Морфометрические измерения проводили по стандартным методикам, принятым в ихтиологии (Правдин, 1966). Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики (Закс, 1976; Лакин, 1990). Достоверность различий определяли с помощью критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Видовые температурные адаптации пищеварительных ферментов рыб

Температурная зависимость физиологических функций организма пойкилотермных животных является одним из наиболее твердо установленных фактов в современной биологии. Считается, что компенсация негативного влияния изменений температуры на скорость ферментативных процессов у пойкилотермных животных осуществляется, преимущественно, на клеточном и молекулярном уровне посредством изменения концентрации ферментов и за счет изменения их свойств (Хочачка, Сомеро, 1988). Температурная адаптация позволяет поддерживать относительную независимость физиологических процессов, в том числе пищеварительных, в зоне температур, характерных для среды обитания различных видов пойкилотермных животных.

Достаточно подробно исследованы температурные адаптации мембранносвязанных пищеварительных ферментов холоднокровных животных, по сравнению с таковыми теплокровных (Егорова и др., 1974; Asgeirsson et al., 1995). При этом показано, что температурные оптимумы одноименных ферментов у них могут различаться на десятки градусов. Более того, подобные результаты получены и при изучении гидролаз рыб, обитающих в среде с разной температурой (Уголев и др., 1976, 1981; Gelman et al., 1989). Убедительно продемонстрировано, что свойства одноименных ферментов коррелируют с экологическими особенностями исследованных пресноводных костистых рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Пономарев, 1995, 1997; Коростелев, Неваленный, 2005).

Интересно отметить, что у судака, леща и белого толстолобика летом наблюдается увеличение термостабильности щелочной фосфатазы, а также увеличивается  $E_{akt}$  (Гельман, Нехамкин, 1979; Gelman et al., 1984; 1992). При исследовании кишечной сахаразы ряда видов рыб, обитающих в условиях Севера (бассейн р. Печора), в ряде случаев выявлены адаптивные перестройки свойств фермента, обеспечивающих температурную компенсацию заключительных этапов гидролиза полисахаридов (Пономарев, 1992а, 1997).

Характеристики пищеварительных ферментов, осуществляющих начальные и заключительные этапы гидролиза углеводов, у лососевых видов рыб, обитающих в водах Камчатского полуострова, ранее не изучались. В связи с этим, объектами исследований являлись наиболее массовые виды рода тихоокеанских лососей - горбуша (*Oncorhynchus gorbuscha*), кета (*O. keta*) и нерка (*O. nerka*), дикая жилая форма радужной форели (*Salmo gairdneri*) или микижа и проходная форма гольца (*Salvelinus alpinus*).

Данные по влиянию температуры инкубации на активность  $\alpha$ -амилазы слизистой кишечника у тихоокеанских лососей представлены на рис. 1. Температурный оптимум  $\alpha$ -амилазы для всех трех видов тихоокеанских лососей соответствует  $30^{\circ}\text{C}$ . Можно видеть, что в зоне постмаксимальных температур формы температурных зависимостей практически совпадают. Необходимо также отметить, что в зоне физиологических температур инкубации ( $0-10^{\circ}\text{C}$ ) относительная активность  $\alpha$ -амилазы кишечника нерки несколько выше, чем у горбуши и кеты (рис. 1Б). Также обращает на себя внимание наиболее узкая зона оптимальных значений температуры для фермента кишечника кеты.

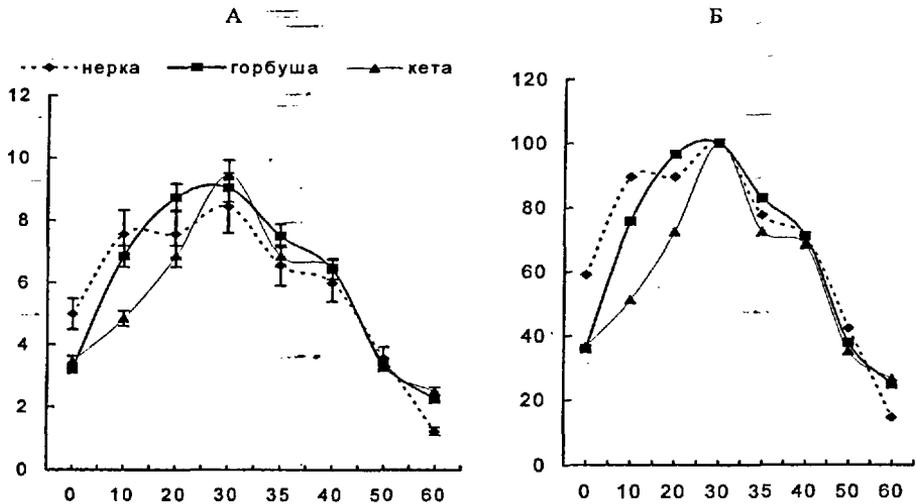


Рис. 1. Зависимость активности  $\alpha$ -амилазы кишечника тихоокеанских лососей от температуры инкубации. По горизонтали – температура ( $^{\circ}\text{C}$ ); по вертикали – (А) - активность фермента ( $\text{mg} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ), (Б) - в % от максимальной активности, принятой за 100.

Величина температурного оптимума  $\alpha$ -амилазы кишечника гольца и микижи на  $5$  и  $10^{\circ}\text{C}$  соответственно выше, чем у исследованных видов тихоокеанских лососей и составляет  $35$  и  $40^{\circ}\text{C}$  (рис. 2). Как видно на рис. 2Б, форма температурной зависимости  $\alpha$ -амилазы кишечника обоих видов рыб очень близка, и только в зоне физиологических температур относительная активность фермента у гольца несколько выше, чем у микижи. Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют также о некоторых различиях в температурных характеристиках мальтазы кишечника исследованных видов тихоокеанских лососей. Как

видно из рисунка, температурный оптимум фермента кишечника нерки и горбуши одинаков и соответствует  $50^{\circ}\text{C}$ , а у кеты на  $15^{\circ}\text{C}$  ниже. Наиболее широкая зона оптимальных значений наблюдается для мальтазы кишечника кеты, а наиболее узкая – нерки (рис. 3Б). Важно отметить, что в зоне физиологических температур относительная активность фермента кишечника нерки ниже, чем у кеты и горбуши.

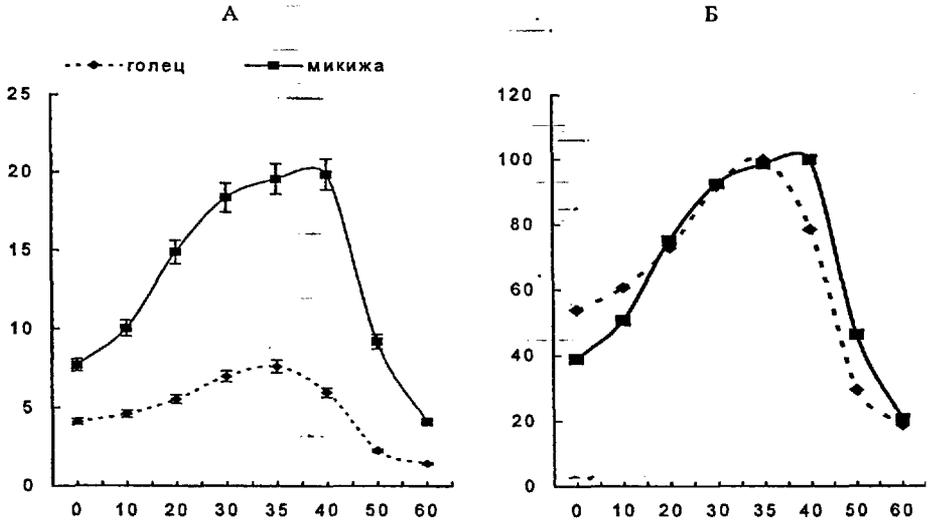


Рис. 2. Зависимость активности  $\alpha$ -амилазы кишечника гольца и микижи от температуры инкубации. По оси абсцисс – температура ( $^{\circ}\text{C}$ ); по оси ординат – (А) - активность фермента ( $\text{mg} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ), (Б) - относительная активность в % от максимальной активности, принятой за 100.

Величина температурного оптимума мальтазы кишечника гольца соответствует  $40^{\circ}\text{C}$ , а у микижи на  $10^{\circ}\text{C}$  выше (рис. 4). Как видно на рис. 4Б форма температурной зависимости мальтазы кишечника обоих видов рыб очень близка, однако в зоне температур, лежащих ниже температурного оптимума, относительная активность фермента у гольца несколько выше, чем у микижи, поэтому в отношении карбогидраз, функционирующих в кишечнике гольца, можно сделать вывод об их адаптированности к функционированию в условиях низких температур. При анализе температурных функций  $\alpha$ -амилазы и мальтазы лососевых рыб можно видеть, что наиболее близки они среди исследованных видов тихоокеанских лососей, а среди них у нерки и горбуши.

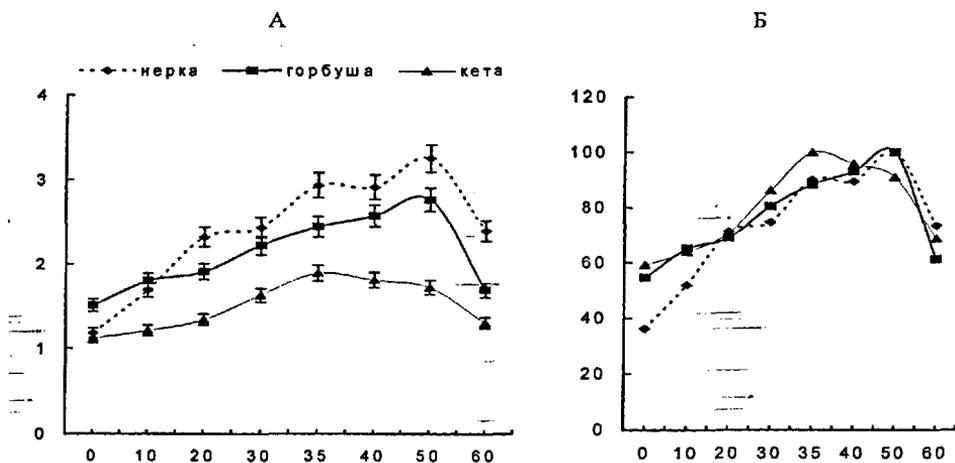


Рис. 3. Зависимость активности мальтазы кишечника тихоокеанских лососей от температуры инкубации. По оси абсцисс – температура (°C); по оси ординат – (А) - активность фермента (мкмоль x г<sup>-1</sup> x мин<sup>-1</sup>), (Б) - относительная активность в % от максимальной активности, принятой за 100.

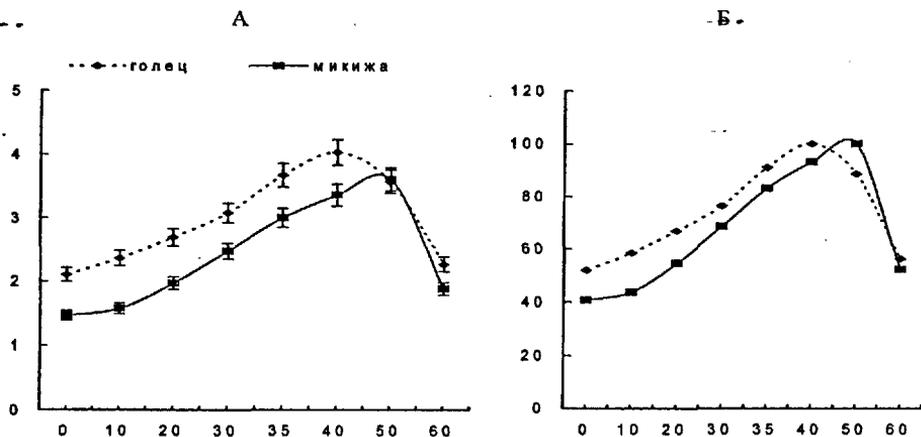


Рис. 4. Зависимость активности мальтазы кишечника гольца и микижи от температуры инкубации. По оси абсцисс – температура (°C); по оси ординат – (А) - активность фермента (мкмоль x г<sup>-1</sup> x мин<sup>-1</sup>), (Б) - относительная активность в % от максимальной активности, принятой за 100.

Полученные данные подтверждают предположение, высказанное В.В. Егоровой с соавторами (1974) о том, что в процессе эволюции могут отбираться в качестве полезного признака соответствия между температурными условиями среды обитания видов и наиболее эффективной конформацией фермента.

Расчет значений  $E_{\text{акт}}$  для  $\alpha$ -амилазы слизистой кишечника исследованных видов лососевых рыб представлен в табл. 1. Можно видеть, что только для фермента кишечника кеты эта величина постоянна во всем исследованном диапазоне температур инкубационной среды и составляет 6,7 кдж/моль. Значения  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза крахмала препаратами слизистой кишечника нерки и горбуши для диапазона температур 0-10<sup>0</sup>С составили 8,3 и 14,8, а при температурах от 10 до 30<sup>0</sup>С – 1,1 и 2,8 кдж/моль, соответственно. Следовательно, на графике Аррениуса имеется излом при температуре выше 10<sup>0</sup>С, а эффективность фермента у этих видов в зоне температур от 10 до 30<sup>0</sup>С, выше в 7 и 5 раз, соответственно.

Таблица 1

Значения энергии активации (дж/моль)  $\alpha$ -амилазы кишечника лососевых рыб при физиологических температурах инкубации

Вид	Диапазон температур инкубации, <sup>0</sup> С		
	0-10	10-20	20-30
Нерка	8275	1095	
Кета	6713		
Горбуша	14812	2796	
Голец	2332	4193	
Микижа	5166	7937	4235

Для  $\alpha$ -амилазы кишечника гольца и микижи, напротив, наблюдается скачкообразное увеличение величины  $E_{\text{акт}}$  при температуре выше 10<sup>0</sup>С. При этом для фермента гольца  $E_{\text{акт}}$  увеличивается почти в два раза для диапазона температур от 10 до 30<sup>0</sup>С, а для фермента микижи увеличение этого показателя в 1,5 раза наблюдается только для температур от 10 до 20<sup>0</sup>С.

Рассчитанные значения  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза мальтозы препаратами слизистой кишечника исследованных видов лососевых рыб представлены в табл. 2. Только для фермента кишечника нерки и гольца эта величина постоянна во всем исследованном диапазоне температур инкубационной среды и составляет 4,8 и 2,6 кдж/моль, соответственно. Для мальтазы из кишечника микижи и кеты на графике Аррениуса

наблюдается излом при температуре 10 и 20<sup>0</sup>С, соответственно, а эффективность фермента в зоне физиологических температур почти в три раза выше. Для фермента кишечника горбуши также наблюдается скачкообразное уменьшение величины  $E_{акт}$ , но при температуре от 10 до 20<sup>0</sup>С.

Данные, касающиеся  $E_{акт}$  карбогидраз кишечника исследованных видов лососевых, свидетельствуют о зависимости этого показателя от типа питания рыб и диапазона температур активного откорма. Так, в диапазоне температур 0-10<sup>0</sup>С минимальные значения  $E_{акт}$   $\alpha$ -амилазы наблюдаются у гольца, мальтазы – у микижи, являющихся хищниками-факультативными бентофагами, которые не прекращают интенсивно питаться при низких температурах воды. Исследование ферментов кишечника тихоокеанских лососей показало, что при температурах ниже 10<sup>0</sup>С, при которых они питаются слабо,  $E_{акт}$  карбогидраз либо увеличивается, либо не изменяется, по сравнению с диапазоном температур (10-20<sup>0</sup>С) наиболее активного питания.

Таблица 2

Значения энергии активации (дж/моль) мальтазы кишечника лососевых рыб в диапазоне физиологических температур инкубации

Вид	Диапазон температур инкубации, <sup>0</sup> С		
	0-10	10-20	20-30
Нерка	4846		
Кета	1736		3941
Горбуша	3540	1205	3120
Гольц	2573		
Микижа	1599	4435	

Таким образом, при исследовании активности и температурных характеристик  $\alpha$ -амилазы и мальтазы из кишечника нерки, кеты, горбуши, микижи и гольца, обитающих в водах Камчатского полуострова, показано, что в кишечнике всех исследованных лососевых видов рыб присутствуют карбогидразы, осуществляющие как начальные, так и заключительные этапы гидролиза углеводов пищи. При анализе температурных характеристик карбогидраз отмечено, что наиболее близки они среди исследованных видов тихоокеанских лососей. Свойства ферментов карбогидразной цепи в большинстве случаев коррелируют с такими экологическими условиями жизнедеятельности разных видов лососевых рыб, как характер питания и температура среды обитания.

Ближние результаты получены и при исследовании камбаловых рыб, обитающих в дальневосточных морях. Так, рассчитанные значения  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза мальтозы препаратами слизистой кишечника звездчатой камбалы для диапазона температур 0-20<sup>0</sup>С составили 0,91-0,92 кдж/моль, а при температурах от 20 до 40<sup>0</sup>С – 2,35-2,36 кдж/моль. Следовательно, на графике Аррениуса имеется излом при температуре 20<sup>0</sup>С, а эффективность фермента в зоне физиологических температур почти в два раза выше. Для мальтазы кишечника белокорого палтуса также наблюдается скачкообразное увеличение величины  $E_{\text{акт}}$ , но при температуре 10<sup>0</sup>С.

Расчет значений  $E_{\text{акт}}$  для  $\alpha$ -амилазы слизистой кишечника обоих исследованных видов камбаловых рыб показал, что эта величина постоянна во всем исследованном диапазоне температур инкубационной среды и составляет 2,16 и 1,7 кдж/моль для фермента звездчатой камбалы и белокорого палтуса соответственно.

Графики Аррениуса для щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы кишечника обоих видов камбаловых рыб имеют излом при 10<sup>0</sup>С. При этом  $E_{\text{акт}}$  в диапазоне физиологических для этих видов рыб температур 0-10<sup>0</sup>С в среднем в два раза ниже, чем при более высоких температурах. Так, в диапазоне температур 0-10<sup>0</sup>С  $E_{\text{акт}}$  для щелочной фосфатазы звездчатой камбалы и белокорого палтуса составляет 7,77 и 13,26, а для температур 10-20<sup>0</sup>С – 14,77 и 22,15 кдж/моль, соответственно. Аналогичная закономерность характерна и для  $E_{\text{акт}}$  процесса гидролиза казеина препаратами слизистой кишечника этих видов рыб (при температурах 0-10<sup>0</sup>С этот показатель соответствует 6,4 и 7,32, а при 10-20<sup>0</sup>С – 15,69 и 12,92 кдж/моль, для звездчатой камбалы и белокорого палтуса, соответственно).

Важно отметить более низкие значения  $E_{\text{акт}}$  для мальтазы, щелочной фосфатазы и суммарных протеиназ в зоне низких температур, характерных для среды обитания исследованных камбаловых видов рыб. Это свидетельствует о большей эффективности гидролиза в их кишечниках при низких температурах, что также указывает на адаптацию мембранносвязанных пищеварительных ферментов. Ближние результаты были получены и при исследованиях кишечных ферментов карповых и осетровых видов рыб, обитающих в разных температурных условиях.

Таким образом, выявлено сходство ферментных систем, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб разных таксономических групп, обитающих в холодных водах и у видов, обитающих в южных водоемах. При этом температурные характеристики пищеварительных ферментов у исследованных видов рыб свидетельствуют об их значительной адаптивности к условиям функционирования, что обеспечивает оптимальное осуществление пищеварительной функции в естественных условиях.

### Индивидуальные температурные адаптации кишечной мальтазы карпов

Индивидуальные адаптации пищеварительных ферментов у рыб одного вида к изменению температуры среды обитания в настоящее время недостаточно изучены. Поэтому в специальном цикле экспериментов исследовали мальтазу кишечника карпов при изменении температуры акклимации. Карпов в течение двух недель выдерживали в аквариумах при температуре воды 18°C (контроль). Затем их делили на три группы: первую содержали при температуре 18°C, вторую – при пониженных до 8 (голодные) и 12°C (сытые), третью – при 28°C. В начале эксперимента и через каждые 7 дней отбирали препараты слизистой кишечника.

Результаты, полученные для фермента из разных отделов кишечника, и для голодающих и для питающихся рыб, акклимированных к повышенным и пониженным температурам в течение и 7 и 14 суток оказались сходными. Характер влияния температуры инкубации на активность мальтазы оказался одинаков для всех групп рыб (рис. 5). Сравнение таких температурных характеристик кишечной мальтазы карпов, содержащихся при разных температурах, как температурный оптимум, относительная активность при низких и высоких температурах инкубации, термостабильность, энергия активации, не позволило выявить адаптивных изменений свойств фермента при изменении температуры акклимации рыб. Так, температурный оптимум гидролиза мальтозы препаратами слизистой кишечника всех групп рыб соответствует 70°C. Относительная активность мальтазы при 0°C составляет 3-5%, при 75°C – 74-78% от максимальной активности, различия для всех исследованных групп рыб отсутствуют. Расчет значений  $E_{\text{акт}}$  гидролиза мальтозы препаратами слизистой кишечника карпов также не позволил выявить зависимости этого показателя от величины температуры среды содержания рыб.  $E_{\text{акт}}$  постоянна во всем исследованном диапазоне температур инкубационной среды и составляет для фермента рыб, экспонированных при температуре 18°C 9,1 кдж/моль, а при температурах 12 и 28°C - 8,7 и 9,0 кдж/моль, соответственно.

Известно, что характер питания и факторы среды оказывают существенное влияние на строение и функционирование пищеварительной системы рыб. В частности, для молоди карпа, выращенной в прудах, полученные данные свидетельствуют, что морфологические и функциональные показатели пищеварительной системы подвержены сезонным изменениям и зависят от интенсивности питания рыб (Соболев, 1991). Большинство авторов полагает, что среди причин, вызывающих эти изменения, главной является температура.

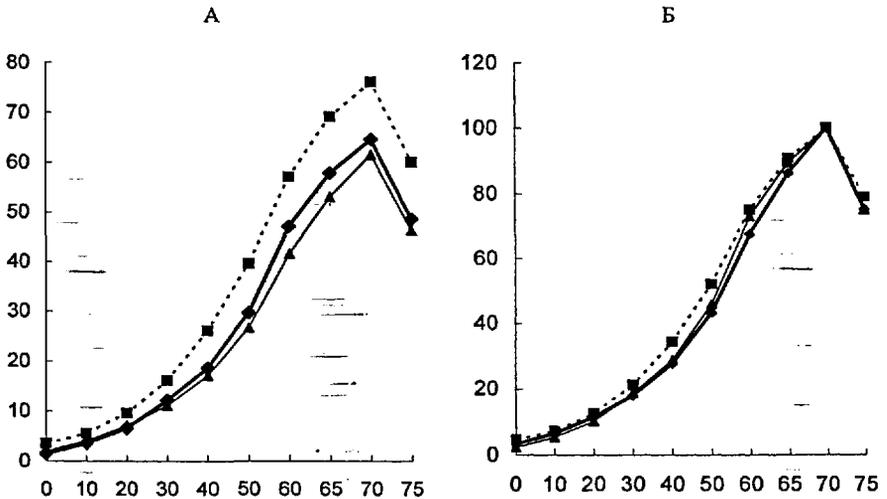


Рис. 5. Влияние температуры инкубации на активность мальтазы слизистой кишечника карпов, акклиматизированных в течение 14 суток при разных температурах среды: 1 – 18°C (контроль), 2 – 12°C, 3 – 28°C. По оси абсцисс – температура инкубации (°C), по оси ординат – скорость реакции, слева в  $\text{мкмоль} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , справа в % от максимальной, принятой за 100.

В связи с этим, нами исследованы весовые и линейные характеристики кишечника карпов, акклиматизированных к разным температурам. Установлено, что при повышении температуры от 18 до 28°C, относительная масса кишечника рыб уменьшается в 1.6 раза ( $p < 0.01$ ), в то время как при понижении от 18 до 12°C значение этого показателя, напротив, увеличивается в 1.2 раза ( $p < 0.05$ ). Изменения массы кишечника карпов при выдерживании в течение двух недель в среде с повышенными и пониженными температурами связаны, в основном, с изменениями массы слизистой оболочки. Действительно, эта величина выше у карпов, акклиматизированных к 12°C, чем к 28°C, в 2.6 раза ( $p < 0.01$ ), в то время как масса мышечной оболочки выше только в 1.3 раза ( $p < 0.05$ ). Необходимо также отметить, что относительная длина кишечника рыб, акклиматизированных к разным температурам, статистически не различается.

При исследовании влияния температуры на морфологические характеристики кишечника голодающих в течение двух недель карпов, установлена сходная закономерность. Однако необходимо отметить, что масса слизистой оболочки кишечника голодавших рыб,

акклимированных к 12 и 28°C, по сравнению с питавшимися, различается менее значительно - лишь в 1,9 раза ( $p < 0.05$ ). Кроме того, при понижении температуры акклимации от 12 до 8°C, этот показатель статистически не изменяется.

Следовательно, температура среды оказывает значительное влияние на весовые характеристики кишечника карпов и практически не влияет на линейные. При понижении температуры акклимации в диапазоне 28-12°C, когда карп способен активно потреблять пищу независимо от его функционального состояния увеличивается масса кишечника. Увеличение массы кишечника вызывается увеличением, как массы слизистой, так и массы мышечной оболочек. Однако масса слизистой оболочки кишечника увеличивается в большей степени.

Гипертрофия органов пищеварительной системы при адаптации к холоду отмечена ранее рядом исследователей. В частности, продемонстрировано (Lee, Cossins, 1988), что у карпов, акклимированных к 10°C, объем слизистой кишечника и его диаметр больше, а складки выше и шире, чем у акклимированных к 30°C. При этом установлено, что количество выростов стенки кишечника одинаково у обеих групп рыб. Сопоставление этих данных с результатами, полученными нами, позволяет заключить, что при понижении температуры увеличивается количество энтероцитов в слизистой оболочке кишечника рыб.

Таким образом, в зоне физиологических для карпа температур наблюдается относительная независимость гидролитических процессов на уровне мембранного пищеварения от влияний температуры среды обитания. Действительно, если при понижении температуры среды активность ферментов на единицу массы слизистой снижается, а при повышении - возрастает (имеется в виду реальная активность ферментов, т.е. определенная при температуре инкубации равной температуре среды содержания рыб), тогда как масса последней, напротив, увеличивается при понижении температуры и уменьшается при повышении, то достигается гомеостатирующий эффект. По-видимому, в процессе эволюции подобный механизм оказался наиболее целесообразным и закрепился генетически (о чем свидетельствуют сходные результаты, полученные при разном функциональном состоянии организма), поскольку он не сопровождается сложными процессами, связанными с адаптивным синтезом молекул пищеварительных ферментов с новыми свойствами при многократных изменениях температуры среды обитания рыб.

Возможно, процесс усвоения пищи у рыб при понижении температуры воды лимитируется не на уровне мембранного гидролиза и всасывания, а на стадиях расщепления биополимеров, связанных с полостными ферментами.

### Температурные характеристики трех форм кишечной мальтазы карповых рыб

Как было продемонстрировано в предыдущих экспериментах, исследование температурных характеристик мальтазы карпов, экспонированных при различных температурах, не позволяет выявить адаптивных изменений свойств фермента к изменению температуры окружающей среды при различных функциональных состояниях организма. Однако, как мы отметили выше, в целом ряде случаев наблюдаются адаптивные приспособления свойств ферментов для видов рыб, обитающих в среде с различными температурами, при этом наблюдаемые свойства ферментов коррелируют с экологическими особенностями исследованных рыб. Мы также отмечали, что исследовались виды рыб, значительно различающиеся температурными условиями среды обитания.

Большая часть работ, касающихся температурных адаптаций, выполнена с использованием в качестве ферментативно-активного препарата гомогенатов тканей и органов. Вместе с тем в настоящее время показано, что большинство собственно кишечных ферментов, в том числе мальтаза, обладают амфипатической структурой и состоят из гидрофильной и гидрофобной частей (Semenza, 1981, 1986; Kenny, Maroux, 1982).

Ферменты с амфипатической структурой молекулы могут быть изолированы из мембраны с помощью неполярных детергентов (например, тритона-X-100) с образованием детергентной формы (Д-формы) фермента. Протеолитическое расщепление связи между гидрофильной и гидрофобной частями молекулы приводит к образованию протеазной формы (П-формы), лишенной гидрофобного домена.

В связи с этим, используя современные возможности, была получена кишечная мальтаза в мембранносвязанной форме (М-форма), Д- и П-формах от различных карповых рыб, что позволило разделить эффекты мембранных компонентов и встроенного в них ферментативно-активного белка, а также роль гидрофобного участка молекулы в температурных адаптациях пищеварительных ферментов.

Было проведено два цикла экспериментов. В первом, для сравнительного изучения были выбраны украинская и ропшинская породы карпа, выращенные, соответственно, в южных (Астраханская обл.) и северных (Ленинградская обл.) прудовых хозяйствах; во втором – украинская порода карпа и белый толстолобик, выращенные в одинаковых температурных условиях (пруды Астраханской обл.), но различающиеся теплолюбивостью в естественных условиях.

Результаты, полученные при исследовании различных форм кишечной мальтазы украинской и ропшинской пород карпа, представлены в табл. 3. Можно видеть, что

температурный оптимум и  $E_{\text{акт}}$  различаются для мембранносвязанной мальтазы кишечника исследованных пород карпа. Значение температурного оптимума М-формы фермента обеих пород карпа на  $5^{\circ}\text{C}$  превышает эту величину для Д-формы.

Таблица 3

Температурные характеристики различных препаратов мальтазы украинской (У) и ропшинской (Р) породы карпов

Обработка препаратов	Фракция	Порода	% фракции	Концентрация белка, мг/мл	Температурный оптимум, $^{\circ}\text{C}$	$E_{\text{акт}}$ кДж/моль
Без обработки	раствор	Р	$71 \pm 5$	$58 \pm 10$	70	$9,2 \pm 0,8$
		У	$58 \pm 3$	$90 \pm 22$	65	$10,0 \pm 0,8$
	осадок М-форма	Р	$29 \pm 5$	$38 \pm 3$	75	$7,1 \pm 0,7$
		У	$40 \pm 3$	$40 \pm 4$	70	$9,2 \pm 0,6$
Тритином-Х-100	раствор	Р	$78 \pm 3$	$103 \pm 16$	70	$9,6 \pm 1,1$
	Д-форма	У	$80 \pm 6$	$127 \pm 10$	65	$8,6 \pm 0,2$
Трипсином	раствор П-форма	Р	$74 \pm 5$	$86 \pm 9$	65	$8,7 \pm 1,0$
		У	$67 \pm 4$	$97 \pm 9$	65	$9,8 \pm 0,1$

Важно отметить, что мембранная форма кишечной мальтазы ропшинской породы карпа, по сравнению с украинской, характеризуется меньшими значениями  $E_{\text{акт}}$ . Различия в величинах температурного оптимума и  $E_{\text{акт}}$  наблюдаются для М- и Д-форм мальтазы кишечника исследованных пород карпа, но отсутствуют для П-формы, лишенной гидрофобного участка.

Результаты, полученные при исследовании различных форм мальтазы кишечника карпа и белого толстолобика, представлены в табл. 4. Как видно из таблицы, температурный оптимум М-формы фермента у карпа выше, чем у белого толстолобика, тогда как для Д- и П-форм мальтазы различия в значениях этого показателя недостоверны (значение критерия Манна-Уитни – 12). Расчет значений  $E_{\text{акт}}$  показывает, что эта величина для всех трех форм мальтазы карпа выше, чем для соответствующих форм фермента белого толстолобика. При этом максимальные различия наблюдаются для  $E_{\text{акт}}$  М-формы мальтазы, а минимальные – для П-формы.

При ультрацентрифугировании основная активность мембранносвязанных ферментов млекопитающих находится в осадке (Уголев, 1985). Так, для мальтазы кишки крыс более

80% ферментативной активности наблюдается в осадке. Активность же мембранной формы мальтазы карпа и белого толстолобика в наших экспериментах составляла от 21 до 42% от всего количества фермента в препарате. По-видимому, кишечная мальтаза карповых рыб легче солюбилизирована, или доля мембранной формы фермента меньше, чем у млекопитающих. У речных раков активность мальтазы и ряда других пищеварительных ферментов также выше в супернатанте (цитозольная фракция), чем в осадке (Никитина, Тимофеева, 1995, 1997). Можно заключить, что ферменты теплокровных животных имеют не только более жесткую структуру (Александров, 1975, 1985), но и, в случае мембранных ферментов, более прочно связаны с мембранами несущих их клеток, по сравнению с ферментами холоднокровных.

Таблица 4

Температурные характеристики различных препаратов мальтазы карпа (К) и белого толстолобика (Т)

Обработка препаратов	Фракция	Вид рыб	% фракции	Концентрация белка, мг/мл	Температурный оптимум, °С	$E_{акт}$ , кДж/моль
Без обработки	раствор	К	79±3	103±11	64,0	6,5±0,2
		Т	58±3	106±12	62,2	6,5±0,8
	осадок М-форма	К	21±3	49±7	65,4	7,1±0,9
		Т	42±3	55±7	62,5	5,5±0,5
Триптоном-Х-100	раствор	К	88±2	170±24	63,8	8,4±0,8
	Д-форма	Т	87±3	164±14	62,1	6,9±0,5
Трипсином	раствор	К	73±3	156±9	62,5	8,1±0,5
	П-форма	Т	62±3	148±4	61,7	7,8±0,6

Другой аспект температурных адаптаций мембранных белков относится к влиянию состава липидного матрикса мембран на свойства ферментов. Многими исследователями было отмечено различие свойств фермент-мембранных комплексов и ферментов, в том числе и гидролитических, отделенных от мембраны (обзоры: Хочачка, Сомеро, 1988; Уголев, Кузьмина, 1993). В наших экспериментах только для мембранной формы мальтазы наблюдались меньшие значения  $E_{акт}$  у ропшинской породы карпов, по сравнению с украинской, что может свидетельствовать о большей эффективности гидролиза мальтозы у

карпов, выращенных в Ленинградской области и приспособленных к пониженным температурам среды обитания.

Таким образом, по мере деградации фермент-мембранных комплексов относительная активность кишечной мальтазы исследованных пород и видов карповых рыб становится близкой. Достоверные различия в величине температурного оптимума, наблюдавшиеся для М-формы фермента, уменьшаются для Д-формы и отсутствуют для П-формы. Это, по-видимому, свидетельствует о важной роли не только мембраны, но и гидрофобного домена в обеспечении адаптации молекулы фермента к температуре.

### **Влияние концентрации водородных ионов на активность пищеварительных ферментов**

Хорошо известно, что каждый фермент характеризуется более или менее узкой областью концентрации водородных ионов, при которой он обладает наибольшей активностью. Поэтому на уровень активности ферментов рыб, наряду с температурой среды обитания, большое влияние оказывает и концентрация ионов водорода в воде – важнейший показатель физико-химических свойств воды. Пищеварительный тракт рыб в естественных условиях находится в прямом контакте с внешней средой, а его содержимое может рассматриваться как часть окружающей среды (Кузьмина, Неваленный, 1983). Следовательно, рН окружающей среды может непосредственно влиять на концентрацию водородных ионов в желудочно-кишечном тракте и, соответственно, на активность ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение. Согласно современным представлениям, основной физиологический эффект низких значений рН воды состоит во влиянии на фермент через изменение конформации активного центра и ионизации субстрата.

Большинство работ, посвященных исследованиям влияния концентрации водородных ионов на пищеварительные ферменты рыб, выполнены в условиях *in vitro* (Уголев, Кузьмина, 1993), когда уровень ферментативной активности при уменьшении рН снижается в результате денатурирующего воздействия кислоты на молекулы гидролаз. Работ же касающихся исследований влияния рН на пищеварительные процессы в условиях *in vivo*, когда, как указывают В.В. Кузьмина с соавторами (1998), помимо попадания закисленной воды в пищеварительный тракт может наблюдаться каскад реакций организма (кислотно-щелочной дисбаланс → закисление крови → нарушение дыхания различных тканей → снижение интенсивности синтеза ферментов → подавление начальных этапов ассимиляции пищи), в литературе крайне мало.

В данной части работы представлены результаты исследования влияния разных концентраций водородных ионов как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* на уровень активности пищеварительных ферментов рыб.

Известно, что уровень активности карбогидраз в кишечнике окуня из кислотных озер в 1,5-2,0 раза, а протеиназ - в 2-9 раз ниже, чем у рыб из нейтрального озера (Кузьмина и др., 1998). Окунь имеет желудок, в котором поддерживается кислая реакция, а так как пища в кишечник поступает из желудка, он может служить своеобразным буфером. В связи с этим, однозначно определить непосредственно или опосредованно влияет увеличение концентрации водородных ионов в среде обитания на пищеварительные ферменты, не представляется возможным. Поэтому для исследования влияния изменения pH среды содержания рыб на уровень активности карбогидраз кишечника в качестве объекта был выбран безжелудочный вид рыб - карп.

Исследования выполнены в аквариальных условиях на сеголетках карпов. Рыбы размещались в аквариумах, в которых в течение 5 ч поддерживалась pH, равная 3, 4, 5, 6 и 7. При pH=3 рыбы через 1 ч погибали. Необходимую концентрацию водородных ионов в аквариумах поддерживали добавлением концентрированной серной кислоты.

Как видно на рисунке 6, влияние повышения концентрации водородных ионов на  $\alpha$ -амилазную, сахаразную, мальтазную и суммарную карбогидразную активность имеет сходный характер с некоторыми вариациями в минимальных и максимальных значениях. Для всех исследованных карбогидраз кишечника карпов наблюдается S-образный характер зависимости активности при увеличении концентрации водородных ионов в воде с минимумом при pH 5-6 и максимумом при pH 4. По-видимому, в наших экспериментах отражено классическое развитие стресс-реакции по Селье (1960, 1972) на увеличение концентрации водородных ионов в среде содержания карпов.

Для каждого фермента имеется оптимальное значение pH, при котором скорость реакции максимальна, при отклонении в любую сторону от этого значения скорость реакции снижается. Оптимумы pH определены для разных пищеварительных ферментов у многих видов пресноводных и морских рыб (обзор: Уголев, Кузьмина, 1993). Однако данных касающихся гидролаз дальневосточных лососей в литературе практически отсутствуют. В связи с этим, исследовали влияние концентрации водородных ионов на активность  $\alpha$ -амилазы, мальтазы, щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы кишечника нерки, горбуши, кеты, микижи и гольца. Для достижения условий, максимально приближенных к естественным, субстрат и ферментативно-активный препарат готовили на растворе Рингера для холоднокровных животных.

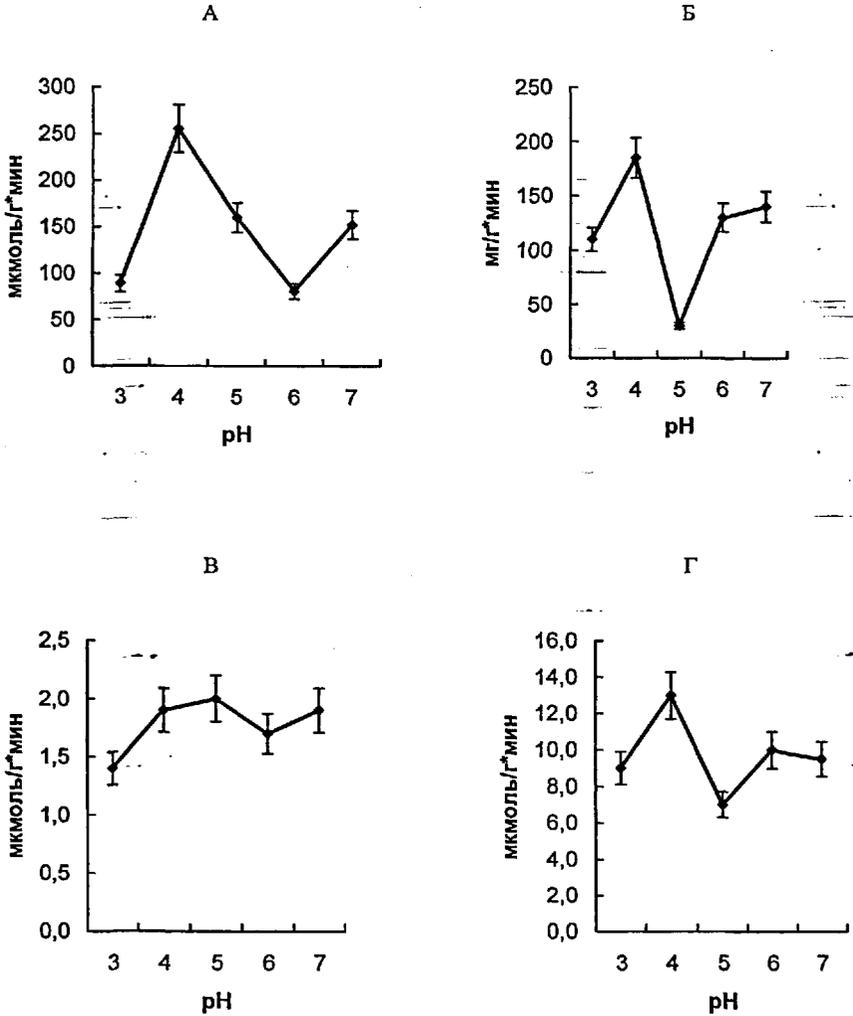


Рис. 6. Влияние концентрации водородных ионов в воде на уровень активности суммарных карбогидраз (А),  $\alpha$ -амилазы (Б), сахаразы (В) и мальтазы (Г) кишечника карпов.

В большинстве случаев у исследованных нами лососевых видов рыб снижение значений pH в инкубационной среде как до 5,0, так и повышение до 10,0 вызывало снижение относительной активности мальтазы на 10-30% от максимума (рис. 7, 8). Литературные данные демонстрируют снижение относительной активности мальтазы при pH 5,0 на 40-60% у пресноводных видов рыб умеренных широт (Кузьмина, Неваленный, 1983). Обнаруженная широкая зона оптимальных значений pH для кишечной мальтазы у всех исследованных лососевых рыб, смещена в сторону щелочных значений pH.

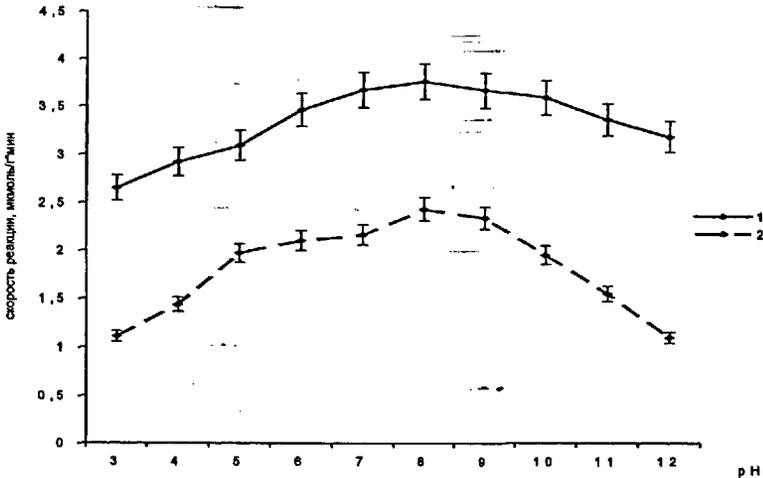


Рис. 7. Влияние разных концентраций pH на уровень активности мальтазы кишечника нерки - 1, горбуши - 2.

Похожие результаты получены и при исследовании уровня активности  $\alpha$ -амилазы слизистой оболочки кишечника у большинства исследованных лососевых рыб, у которых максимальная гидролитическая активность  $\alpha$ -амилазы обнаруживается при pH 8,0-9,0. Сопоставляя полученные результаты с литературными данными, можно отметить, что у пресноводных костистых видов рыб, исследованных ранее, pH – оптимум  $\alpha$ -амилазы находится в диапазоне значений pH от 6,5 до 7,5 (Уголев, Кузьмина, 1993).

Снижение pH инкубационной среды до 5,0 вызывает снижение относительной активности  $\alpha$ -амилазы до 40-80% от максимума, в то время как у разных видов пресноводных костистых рыб, исследованных ранее, при данных значениях pH относительная активность фермента снижается гораздо значительно – до 15-40% от

максимальной величины (Кузьмина, Неваленный, 1983; Уголев, Кузьмина, 1993). Те же различия прослеживаются и при увеличении рН среды до 10, когда у исследованных нами лососевых рыб относительная активность фермента сохраняется в пределах 50-90% от оптимальной, а у представителей бассейна р. Волга – только 40-80% от максимального значения (Уголев, Кузьмина, 1993). Для щелочной фосфатазы в большинстве случаев установлены сходные результаты.

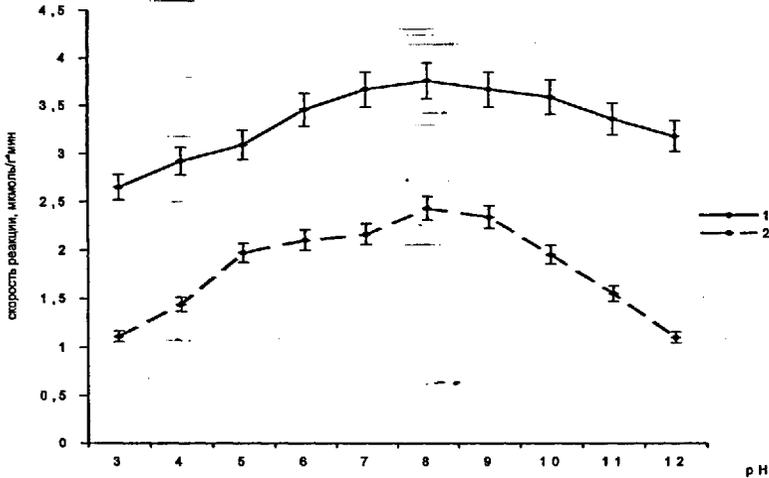


Рис. 8. Влияние разных концентраций pH на уровень активности мальтазы кишечника кеты - 1, гольца - 2.

Исследование влияния разных концентраций водородных ионов на уровень активности суммарной протеиназы слизистой оболочки кишечника ряда видов рыб Волжского региона показал, что оптимум pH для данной группы ферментов варьирует от 7,5 до 10,0 (Калас, 1978; Хаблюк, Проскураков, 1983). В наших исследованиях было показано, что максимальная активность суммарной протеиназы кишечника большинства тихоокеанских лососей обнаружена при pH 11,0.

Таким образом, оптимальные значения реакции среды (pH) для гидролаз кишечника лососевых рыб (горбуша, кета, нерка, голец, микижа), наблюдаются при pH 8,0 (щелочная фосфатаза,  $\alpha$ -амилаза, мальтаза) и pH 11,0 (суммарная протеиназа), при этом наблюдается

более широкая зона оптимальных значений рН, по сравнению с пресноводными костистыми рыбами умеренных широт.

### **Влияние состава потребляемой пищи на эффективность пищеварительных процессов**

Проблема адаптации пищеварительной системы животных к составу пищи имеет более чем вековую историю. Еще на рубеже 19-20 веков классическими работами И.П. Павлова (1951) была показана непосредственная зависимость между составом пищи и уровнем секреции панкреатических ферментов.

Возможность перестройки ферментного спектра в ответ на изменение состава пищи рыб долгое время дискутировалась (обзор: Barrington, 1957). Однако, в настоящее время эта возможность подвержена в ряде работ для основных экологических групп рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы. Более того, дифференциация спектра ферментов у рыб, потребляющих разные виды пищи, наблюдается уже в раннем посэмбриогенезе. Эта особенность продемонстрирована, в частности, для лососевых (Пономарев, 1995) и растительноядных карповых рыб (Неваленный и др., 1988, 1989; Волкова, Зайцев, 1997, 1999, 2001; Абдурахманов и др., 2003).

При этом в ответ на изменение композиции пищи приспособление в одних случаях достигается за счет репрессии, в других - индукции синтеза различных ферментов (Уголев, 1978; Груздков и др., 1986). Кроме того, продемонстрировано, что активность одних гидролаз изменяется быстрее, других - медленнее, а для третьих отличается стабильностью (Уголев, 1972). Таким образом, исследование одного фермента, как правило, не дает решения вопроса об адаптированности или неадаптированности системы, в связи с этим необходимо характеризовать ферментный спектр как можно более широко.

Интерес к данной проблеме обусловлен тем, что сведения о характере адаптированности пищеварительной системы к кормам различной рецептуры, возможно, позволят контролировать эффективность их применения при индустриальном выращивании рыб. Кроме того, исследование данного вопроса позволит приблизиться к пониманию особенностей протекания пищеварительного процесса в естественных условиях.

Ферменты, осуществляющие гидролиз углеводов в кишечнике лососевых видов рыб, изучены наиболее полно на примере радужной форели (Kifanicado, Tachino, 1960; Nagauma, Saito, 1968; Plantikow, 1985; Василевский, Самойлова, 1987; Hidalgo et al., 1999). При этом большинство работ касается характеристик  $\alpha$ -амилазы. Сравнительные исследования показали, что активность этого фермента у хищной форели ниже, чем у всеядных видов рыб,

но при поедании корма, богатого крахмалом, в содержимом кишечника она повышается в 15 раз (Spannhof, Plantikow, 1983). Исследование  $\alpha$ -амилазы кишечника у арктического гольца продемонстрировало очень низкую активность фермента - в 400 раз ниже, чем у карпа (Reimer, 1986).

При исследовании уровня активности карбогидраз у разных видов пресноводных костистых рыб показана зависимость между активностью ферментов и принадлежностью рыб к той или иной экологической группе. Так, активность карбогидраз возрастает в ряду (типичные хищники) - (хищники-факультативные бентофаги и планктофаги) - (типичные бентофаги и планктофаги). При этом наиболее значительные различия выявлены для  $\alpha$ -амилазы. Величины максимальной активности фермента (у карпа) превышают минимальные (у щуки) в 70-400 раз. Диапазон изменчивости уровня активности мальтазы много ниже - в 4 раза (карась - щука) (Уголев, Кузьмина, 1993).

Уровень активности  $\alpha$ -амилазы кишечника у исследованных лососевых видов рыб также несколько различается (табл. 5). Так, максимальная ферментативная активность, отмеченная у микижи, превышает минимальную (у кеты и гольца) более чем в два раза. Среди тихоокеанских лососей активность кишечной  $\alpha$ -амилазы максимальна у нерки, статистически недостоверно меньше у горбуши и достоверно минимальна ( $p < 0.05$ ), по сравнению с ними, у кеты.

Таблица 5

Уровень активности карбогидраз кишечника лососевых рыб при температуре 10°C

Фермент	Вид лососевых рыб				
	горбуша	кета	нерка	микижа	голец
$\alpha$ -амилаза, мг х г <sup>-1</sup> х мин <sup>-1</sup>	6,85±0,58 (n=10)	4,84±0,73 (n=11)	7,57±0,50 (n=9)	10,03±0,12 (n=10)	4,62±0,36 (n=10)
мальтаза, мкмоль х г <sup>-1</sup> х мин <sup>-1</sup>	1,80±0,05 (n=10)	1,21±0,04 (n=11)	1,69±0,04 (n=9)	1,58±0,01 (n=10)	2,36±0,09 (n=10)

Как видно из таблицы 5, уровень активности кишечной мальтазы достоверно ( $p < 0.05$ ) ниже у кеты, по сравнению со всеми исследованными видами, а у гольца максимален и почти в два раза выше. При этом для тихоокеанских лососей наблюдается закономерность, отмеченная и при исследовании  $\alpha$ -амилазы - более высокий уровень активности кишечной мальтазы характерен для горбуши и нерки, по сравнению с этим показателем для кеты ( $p < 0.05$ ). Необходимо также отметить, что для карбогидраз кишечника гольца и микижи

наблюдается противоположная зависимость – максимальному уровню активности одного фермента соответствуют минимальные значения для другого.

Известно, что исследованные нами виды тихоокеанских лососей являются планктофагами-факультативными хищниками. Так, основной пищей кеты в период летнего откорма в прибрежных водах восточного побережья Камчатки являются крылоногие моллюски, эвфаузииды и молодь рыб; горбуши – рыбы, эвфаузииды и гиперииды; нерки – эвфаузииды, гиперииды и калянусы. При этом наиболее сходна пища горбуши и нерки (индекс пищевого сходства до 78%), что обусловлено равным потреблением эвфаузиид и гипериид (Андриевская, 1958, 1966). Аналогичные результаты были продемонстрированы и при исследовании питания тихоокеанских лососей в море в последние годы. Так, В.В. Максименковым с соавторами (2002) также было показано, что максимальное пищевое сходство наблюдается у горбуши и нерки. Данное обстоятельство хорошо объясняет отсутствие различий уровня активности исследованных карбогидраз в кишечнике этих видов тихоокеанских лососей.

В питании кеты обычно основное значение имеют молодь рыб, крылоногие моллюски и кишечнорастворимые, которые практически не встречаются в пище нерки и горбуши (Максименков и др., 2002). Поскольку углеводов в пище кеты значительно меньше, чем в пище двух других видов, это и объясняет минимальный уровень активности как мальтазы, так и  $\alpha$ -амилазы в её кишечнике среди исследованных видов тихоокеанских лососей. Действительно, известно, что амилолитическая активность пищеварительного тракта у различных видов рыб уменьшается по мере увеличения белковых и уменьшения углеводных компонентов в характерной для вида пище (Уголев, Кузьмина, 1993). Более того, имеются многочисленные сведения и об адаптации рыб на уровне активности пищеварительных ферментов к диете (Кузьмина, 1981; Зайцев и др., 1990; Неваленный и др., 1997; Абдурахманов и др., 2003).

Жилую форму микижи (Кохменко, 1972а; Саввантова и др., 1973) и проходного гольца в речной период жизни (Кохменко, 1972б; Тиллер, Введенская, 1988) характеризуют как хищников-факультативных бентофагов. Также известно, что основу питания гольца в период морского нагула составляют гиперииды и рыба (Grainger, 1953; Андриевская, 1957). Выше отмечено, что уровень активности  $\alpha$ -амилазы в кишечнике микижи максимален. Данный факт, на первый взгляд, противоречит хорошо известным из литературы сведениям о низкой активности этого фермента у хищных рыб (Пономарев, 1992; Уголев, Кузьмина, 1993). Однако необходимо отметить, что среди исследованных нами видов лососевых рыб только микижа в период сбора материала активно питалась. Кета, горбуша, нерка и голец

экзогенно не питались, так как находились на стадии нерестовой миграции. Возможно, в период нагула активность  $\alpha$ -амилазы в кишечнике у этих видов возрастает в результате секреции поджелудочной железы и может быть даже выше, чем у микижи. Так, при сравнении суточной динамики суммарной карбогидразной активности в слизистой кишечника у голодавших и питавшихся карпов продемонстрировано, что у рыб, получавших корм, ферментативная активность в два раза выше в любое время суток (Неваленный и др., 1991).

По-видимому, этим же можно объяснить повышенную активность мальтазы из кишечника гольца. Общеизвестно, что у тихоокеанских лососей в период нерестовой миграции происходит угасание пищеварительной функции и после нереста происходит гибель, в то время как голец после нереста начинает активно питаться (Тиллер, Введенская, 1988) и у него восстанавливается нормальное пищеварение. Повышенная активность кишечной мальтазы у этого вида в период эндогенного питания может свидетельствовать о продолжении синтеза этого фермента и его накоплении в энтероцитах.

В целом можно заключить, что для рыб различных таксономических групп спектр пищеварительных ферментов кишечника и уровень их активности определяется характером потребляемой пищи в естественных условиях.

В реально протекающем гидролитическом процессе одновременно перевариваются белки, жиры и углеводы, которые определенным образом влияют друг на друга, что было достаточно подробно исследовано на высших позвоночных животных (обзоры: Уголев, 1972; Кушак, 1983). Установлены эффекты взаимодействия на уровне субстратов мембранного пищеварения, кроме того, продемонстрирована возможность взаимодействия молекул интактных биополимеров. Например, некоторые белки тормозят расщепление жиров (Kronal et al., 1968), но стимулируют переваривание лактозы (Блюгер и др., 1978), которая, в свою очередь, уменьшает усвоение белка и жира (Leichter, Tolensky, 1975). Имеются отдельные сведения и о взаимодействии пищевых веществ в процессе гидролиза в кишечнике рыб (Хаблюк и др., 1985; Hofer, Sturmbauer, 1985; Кузьмина, 1987; Gasser, Kirshner, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Бедняков, 2004).

При исследовании полисубстратного пищеварения, как правило, пользуются простейшей моделью одновременного переваривания двух различных пищевых веществ. Для того чтобы усложнить модель, нами были проанализированы не только бисубстратные, но и трисубстратные взаимодействия. Исследованы осетровые, лососевые, карповые и камбаловые виды рыб. Полученные результаты оказались очень близки, поэтому приводим данные касающиеся наиболее подробно изученного семейства – лососевых.

Данные, касающиеся активности щелочной фосфатазы, полученные при инкубации ферментативно-активных препаратов слизистой оболочки кишечника исследованных лососевых рыб в моно- (контроль), ди- и трисубстратной среде, представлены на рисунке 9. Как видно из рисунка, практически у всех видов в присутствии казеина происходит повышение уровня активности щелочной фосфатазы, по сравнению с контролем (на 80% - у нерки, на 73% - у горбуши, на 36% - у кеты и на 9% - у гольца). Исключением является микижа, у которой отмечен обратный эффект - снижение уровня активности фермента на 10%.

При добавлении мальтозы происходит снижение уровня активности энзима у нерки, горбуши и кеты, в то время как у микижи и гольца отмечен противоположный процесс. Совместное присутствие этих биополимеров приводит к возрастанию активности щелочной фосфатазы слизистой кишечника всех исследуемых видов лососевых рыб.

Следует отметить, что наибольшее увеличение ферментативной активности в трисубстратной среде по сравнению с дисубстратной, когда отмечалось действие мальтозы, зафиксировано у горбуши, у которой произошел рост активности фермента на 89%, тогда как у нерки уровень активности увеличился на 80%, у кеты - на 38%, у микижи - на 19%, а минимальное увеличение отмечено у гольца - на 16%.

В присутствии казеина максимальный рост активности фермента вновь зарегистрирован у горбуши (на 71% от уровня активности щелочной фосфатазы при совместном действии биополимеров), а минимальный - у кеты (на 30%); у остальных видов наблюдалось следующее изменение в уровне активности фермента: у нерки произошло повышение ферментативной активности на 46%, у гольца - на 39%, а у микижи - на 33%. При сравнении изменения уровня активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника у лососевых рыб в средах, где казеин и мальтоза действуют раздельно, отмечено, что у нерки, горбуши и кеты произошло снижение уровня активности фермента при действии мальтозы на 34%, 18% и 8% соответственно, в то время как у гольца и микижи отмечен рост активности щелочной фосфатазы на 23% и 14%, соответственно.

Данные, полученные при исследовании суммарной протеиназы представителей лососевых видов рыб, показаны на рисунке 10. Можно отметить, что у кеты и гольца происходит заметное снижение скорости ферментативного расщепления белка при добавлении мальтозы, по сравнению с контрольным значением, в то время как у нерки оно весьма незначительно, а у горбуши не наблюдается. У микижи кеты и гольца отмечен рост активности этой группы ферментов в присутствии п-нитрофенилфосфата Na, тогда как у остальных видов происходит снижение уровня активности суммарных протеиназ. В

трисубстратной среде, как и при исследовании щелочной фосфатазы, наблюдается значительное повышение уровня активности суммарной протеиназы у всех исследованных лососевых видов рыб.

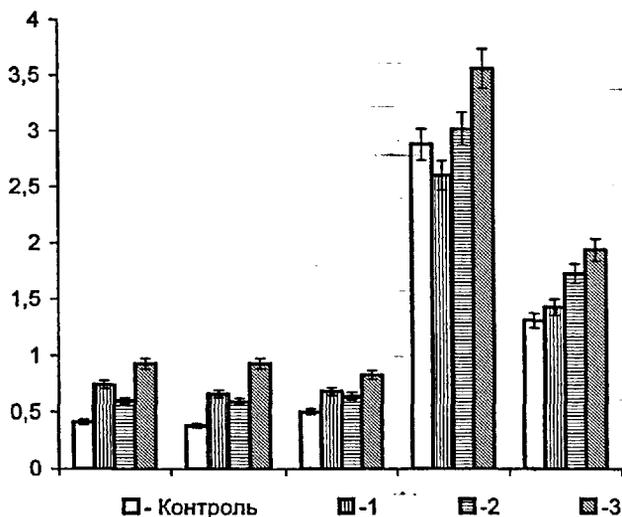


Рис. 9. Уровень активности щелочной фосфатазы слизистой кишечника (слева направо) нерки, горбуши, кеты, микижи и гольца. (По горизонтали: К – контроль, 1 – п-нитрофенилфосфат Na+казеин 1%, 2 – п-нитрофенилфосфат Na+мальтоза 2%, 3 – п-нитрофенилфосфат Na+казеин 1%+мальтоза 2%. По вертикали: скорость реакции (мкмоль/мин\*г).

Кроме того, отмечены следующие различия в изменении уровня активности суммарной протеиназы. Максимальное увеличение скорости гидролиза казеина, по сравнению с действием мальтозы в отдельности и при совместном влиянии мальтозы и п-нитрофенилфосфата Na, зафиксировано у микижи, у которой произошел рост ферментативной активности на 107%, у кеты отмечен несколько сниженный уровень активности суммарной протеиназы – на 61%, у нерки – на 48%, горбуши – на 36%, а у гольца наблюдается самое низкое значение – 19%.

Отмечены следующие изменения в уровне активности исследуемой группы ферментов при сопоставлении действия трисубстратной среды и п-нитрофенилфосфата Na в отдельности: у нерки скорость гидролиза казеина при совместном действии мальтозы и п-

нитрофенилфосфата Na на 51% выше, чем при действии p-нитрофенилфосфата Na отдельно, у микижи – на 58%, у горбуши – на 46%, у гольца – на 42%, у кеты – на 31%. Продемонстрировано, что у нерки, горбуши и гольца происходит снижение уровня активности суммарной протеиназы в присутствии p-нитрофенилфосфата Na, по сравнению с действием мальтозы на 3%, 10% и 23%, соответственно. Однако у кеты и микижи отмечен противоположный эффект и наблюдается рост активности ферментов на 3% и 49%, соответственно.

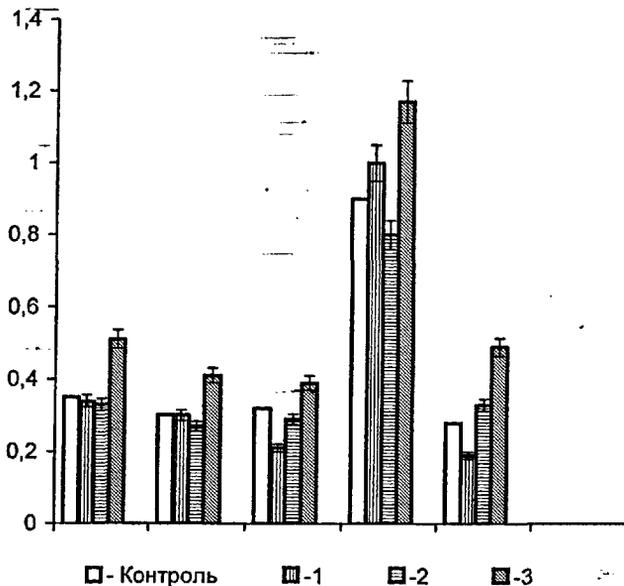


Рис. 10. Уровень активности суммарной протеиназы слизистой кишечника (слева направо) нерки, горбуши, кеты, микижи и гольца. По горизонтали: К – контроль, 1 – казеин 1% + мальтоза 2%, 2 – казеин 1%+p-нитрофенилфосфат Na, 3 – казеин 1%+p-нитрофенилфосфат Na+мальтоза 2%. По вертикали: скорость реакции (мкмоль/мин\*г).

Результаты влияния различных пищевых веществ на уровень активности мальтазы показаны на рисунке 11. Можно видеть, что у всех видов произошел рост уровня активности мальтазы при добавлении казеина относительно контроля. Так, у нерки уровень ферментативной активности мальтазы увеличился на 8%, у горбуши – на 10%, у кеты и микижи на – 15%, у гольца – на 24%. p-Нитрофенилфосфат Na вызвал обратное воздействие

на уровень активности мальтазы практически у всех видов, за исключением микижи, у которой произошло увеличение ферментативной активности на 4%. Так, наблюдается снижение активности этого фермента у нерки на 14%, у горбуши – на 20%, у кеты – на 21% и у гольца – на 33%.

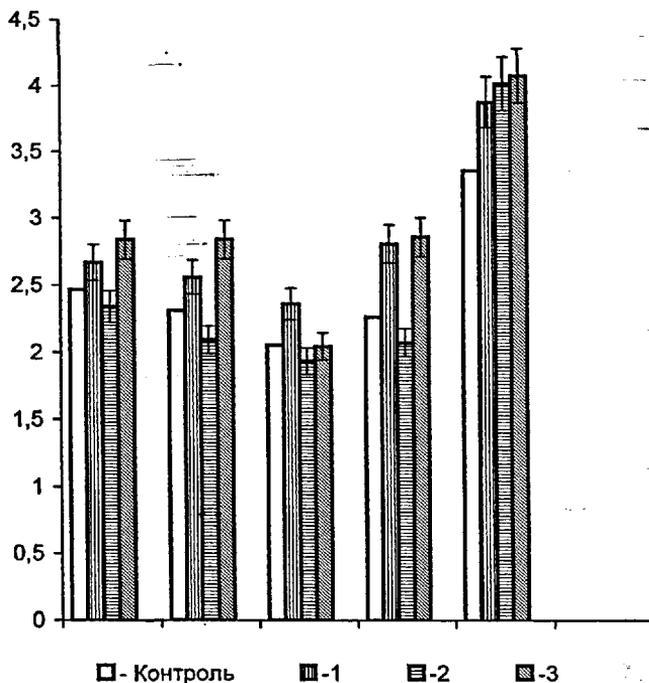


Рис. 11. Уровень активности мальтазы слизистой кишечника (слева направо) нерки, горбуши, кеты, микижи и гольца. По горизонтали: К – контроль, 1 – мальтоза 2%+казеин 1%, 2 – мальтоза 2%+п-нитрофенилфосфат Na, 3 – мальтоза 2%+казеин 1%+п-нитрофенилфосфат Na. По вертикали: скорость реакции (мкмоль/мин\*г).

При совокупном действии биополимеров уровень ферментативной активности мальтазы повышается, но очень незначительно, по сравнению с уровнем активности в данной среде щелочной фосфатазы и суммарной протеиназы. Особенно невелико ее изменение в трисубстратной среде относительно дисубстратной, куда был добавлен казеин: у нерки и микижи уровень активности фермента повысился на 6%, а у горбуши, гольца и кеты – лишь на 2%. Практически у всех видов заметное повышение скорости гидролиза мальтозы

можно отметить при совместном действии двух субстратов, по сравнению с отдельным присутствием в среде п-нитрофенилфосфата Na, которая у нерки увеличилась на 20%, у кеты – на 23%, у горбуши – на 32%, у гольца – на 35% и лишь у микижи эта величина увеличилась незначительно – на 2%.

При раздельном действии казеина и п-нитрофенилфосфата Na отмечены следующие изменения ферментативной активности. У нерки, горбуши, гольца и кеты наблюдается снижение активности мальтазы в присутствии второго субстрата относительно первого на 14%, 20%, 33% и 21%, соответственно, а у микижи, напротив, отмечается повышение активности фермента в среде, где присутствует п-нитрофенилфосфат Na, в отличие от отдельного воздействия казеина, – на 4%.

Сопоставление влияния модификаторов различной природы на одноименные ферменты у рыб разных видов позволило выявить неоднозначность их эффектов. Так, при исследовании активности щелочной фосфатазы сибирского осетра наблюдается тенденция к снижению уровня активности фермента в присутствии казеина, в то время как у нерки, горбуши, кеты и гольца происходит увеличение ферментативной активности, а у микижи результаты идентичны результатам, продемонстрированным для сибирского осетра.

Приведенные выше данные свидетельствуют, что во всех случаях при исследовании карбогидраз, протеаз и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника рыб в присутствии трех субстратов происходит активирующий эффект. В то же время одно и то же вещество может служить активатором для одного ферментативного процесса и ингибитором для другого (например, уровень активности щелочной фосфатазы в присутствии казеина у нерки заметно увеличивается, а у микижи – снижается).

Важно отметить, что в наших экспериментах во всех случаях трисубстратных взаимодействий при исследовании слизистой кишечника рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, обитающих как в пресной, так и в морской среде, а также у проходных видов рыб обнаружен только активирующий эффект. Необходимо еще раз подчеркнуть, что нами исследовались как общая протеазная и карбогидразная активности слизистой кишечника рыб, так и отдельные мембранные ферменты мальтаза и щелочная фосфатаза.

Таким образом, состав потребляемой пищи непосредственным образом влияет на эффективность мембранного пищеварения в кишечнике рыб разных таксономических и экологических групп посредством либо индукции, либо редукции синтеза соответствующих ферментов, в зависимости от композиции диеты, а также за счет модификаторного эффекта компонентов пищевой смеси на уже имеющийся в кишечнике пул гидролаз.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индивидуальные температурные адаптации для мембранносвязанных пищеварительных ферментов у карпа отсутствуют. При этом не вызывают сомнения результаты многочисленных исследований (Егорова и др., 1974; Гельман, 1976; Кузьмина, 1985; Уголев и др., 1990; Кузьмина и др., 1999;), а также полученные нами данные о том, что ферментативно-активные белки рыб, различающихся температурными условиями существования, обладают значительной адаптированностью к условиям жизнедеятельности. Следовательно, имеют место существенные различия в стратегиях температурных адаптаций гидролитических систем в процессе эволюции и в течение индивидуальной жизни особи. В первом случае, адаптация к температурным условиям среды обитания достигается за счет изменения свойств и количества макромолекул, функционирующих в энтероцитах, во втором - за счет варьирования численности популяции кишечных клеток на фоне неизменных характеристик фермент-мембранных комплексов.

Следует отметить, что весьма значительные различия температурных характеристик кишечной мальтазы карповых рыб, которые наблюдались в наших экспериментах для комплекса фермент-мембрана, резко уменьшаются или исчезают при попытках охарактеризовать свойства фермента, отделенного от мембраны в детергентной форме, а также в протеазной, т.е. лишенной гидрофобного участка. Это позволяет сделать чрезвычайно важный вывод о том, что физиологические особенности скорее обусловлены пространственными и временными сочетаниями имеющихся функциональных белков, а не образованием новых молекулярных структур. Возможно, при естественном отборе сохраняются оригинальные сочетания стандартных функциональных блоков, а не образуются новые. Полученные данные являются чрезвычайно убедительным примером, подтверждающим развивавшуюся в последние годы жизни акад. А.М. Уголевым (1979, 1982, 1983, 1985, 1987, 1990) концепцию о блоковом строении самых различных биологических структур и функций, предполагающей, что естественный отбор приводит к появлению новых сочетаний стандартных функциональных блоков, а не к образованию новых молекулярных структур.

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 изменение 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 собственникошечным 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 (обзоры: Хочачка, Сомеро, 1977, 1988; Кушак, 1983; Адаптационно-компенсаторные процессы ... 1991 и др.). Естественно, что в процессе полисубстратного пищеварения регуляция активности пищеварительных процессов не связана с синтезом белка, на который необходимо определенное время (минуты, часы), а осуществляется практически мгновенно, иногда в доли секунды, за счет изменения активности ферментов в результате их связывания с тормозящими или стимулирующими модификаторами.

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

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы ферментные системы, обеспечивающие процессы мембранного пищеварения у рыб, обитающих в холодных водах и у видов, обитающих в южных водоемах. Показано, что температурные характеристики (относительная активность при низких и высоких температурах инкубации, энергия активации) пищеварительных ферментов у исследованных групп видов рыб свидетельствуют об их значительной адаптированности к условиям функционирования, что обеспечивает оптимальное осуществление пищеварительной функции в естественных условиях.

2. Изменение температуры акклимации не вызывает адаптивных изменений уровня активности мембранных гидролаз, что подтверждается отсутствием, в большинстве случаев, статистически значимых различий в активности при стандартной температуре (25<sup>0</sup>C)

мембранносвязанных ферментов у карпов, содержащихся при 18<sup>0</sup>С, а затем акклимированных в течение одной-двух недель при температурах 8; 12; 28<sup>0</sup>С. Содержание карпов при различных температурах не приводит к изменению исследованных свойств (температурный оптимум, относительная активность при низких и высоких температурах инкубации, энергия активации) мембранносвязанной мальтазы кишечника рыб.

3. Температура среды содержания оказывает значительное влияние на морфологические характеристики кишечника карпов. При акклимации рыб к пониженной температуре относительная масса кишечника увеличивается, что связано с гипертрофией слизистой оболочки. Так, относительная масса слизистой оболочки кишечника у рыб, акклимированных в течение двух недель к температуре среды 12<sup>0</sup>С, для питавшихся карпов в 2,6 раза, а для голодавших в 1,9 раза выше, чем у рыб, акклимированных к температуре 28<sup>0</sup>С. При изменении температуры среды содержания рыб относительная масса мышечной оболочки изменяется незначительно.

4. Сравнение морфологических и функциональных характеристик кишечника карпа, акклимированного к различным температурам, позволяет заключить, что гомеостаз мембранного пищеварения при изменении температуры воды обеспечивается, в частности, за счет регуляции массы слизистой оболочки кишечника рыб, тогда как активность и свойства кишечных ферментов не изменяются. По-видимому, этот механизм особенно важен для сезонных адаптаций пищеварительной системы рыб.

5. Сопоставление значений температурных оптимумов и энергии активации мембранносвязанной мальтазы кишечника карповых рыб позволило выявить видовые (каarp, белый толстолобик) и внутривидовые (украинская и ропшинская породы карпа) различия в свойствах фермент-мембранного комплекса, направленность которых свидетельствует о наличии температурных адаптаций на уровне ферментов мембранного пищеварения. Установлено, что при разрушении фермент-мембранного комплекса детергентами и протеазами видовые и внутривидовые различия в свойствах мальтазы исследованных карповых рыб исчезают. Поскольку температурные адаптации мембранносвязанных ферментов кишечника карповых рыб осуществляется не путем образования молекул фермента с модифицированными свойствами, а на уровне комплекса фермент-мембрана – они являются фенотипическими.

6. Показано, что кишечная мальтаза карповых рыб легче солюбилизируется, чем у млекопитающих. Так, при ультрацентрифугировании активность мембранной формы (осадок) мальтазы карпа и белого толстолобика составляет от 21 до 42% от всего количества фермента в препарате, а у крыс – 80%. Следовательно, ферменты теплокровных животных

имеют не только более жесткую структуру, но и, в случае мембранных ферментов, более прочно связаны с мембранами несущих их клеток, по сравнению с ферментами холоднокровных.

7. Адаптация пищеварительной функции кишечника рыб к температуре среды достигается путем взаимодействия молекул ферментов и компонентов мембраны эритроцитов, а также за счет изменения массы слизистой оболочки кишечника на фоне неизменных характеристик фермент-мембранных комплексов. Полученные данные являются чрезвычайно убедительным примером, подтверждающим концепцию о блоковом строении самых различных биологических структур и функций, предполагающей, что естественный отбор приводит к появлению новых сочетаний стандартных функциональных блоков, а не к образованию новых молекулярных структур.

8. В экспериментах по влиянию различных концентраций водородных ионов в среде содержания карпов на активность карбогидраз кишечника показано, что наблюдается S-образный характер зависимости активности  $\alpha$ -амилазы, мальтазы, сахаразы и суммарных карбогидраз при увеличении концентрации водородных ионов в воде с минимумом при pH 5-6 и максимумом при pH 4.

Оптимальные значения реакции среды для гидролаз кишечника лососевых рыб (горбуша, кета, нерка, голец, микижа), наблюдаются при pH 8,0 (щелочная фосфатаза,  $\alpha$ -амилаза, мальтаза) и pH 11,0 (суммарная протеиназа). Сопоставление pH-функций, полученных для пищеварительных ферментов лососевых рыб, обитающих в водоемах Камчатки, позволяет отметить широкую зону оптимальных значений pH, по сравнению с пресноводными костистыми рыбами умеренных широт.

9. У рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, но близких по характеру питания, наблюдается сходное соотношение состава и активности мембранных гидролаз, а у рыб таксономически близких, различающихся по экологии, напротив, отмечаются значительные различия.

10. При исследовании ферментативно активных препаратов слизистой кишечника осетровых, лососевых, карповых и камбаловых выявлены процессы взаимодействия субстратов ферментативных реакций в условиях *in vitro* для всех исследованных групп пищевых веществ. Во всех случаях трисубстратных взаимодействий при исследовании слизистой кишечника рыб, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы, обитающих как в пресной, так и в морской среде, а также у проходных видов рыб обнаружен только активирующий эффект.

**Список основных работ опубликованных по теме диссертации**

1. Неваленный, А. Н. Влияние концентрации водородных ионов в воде на активность некоторых карбогидраз кишечника карпа [Текст] / А. Н. Неваленный, С. Г. Коростелев, М.И. Карпюк // 1-ая Всес. конф. по рыбохоз. токсикол.: тез. докл. Ч. 2. - Рига, 1989. - С. 51-52.
2. Коростелев, С. Г. Температурная адаптация некоторых кишечных карбогидраз у рыб [Текст] / С. Г. Коростелев // Механизмы регуляции физиологических функций: тез. докл. - Ленинград, 1988. - С. 53.
3. Сухова, З.А. Характеристика активности некоторых пищеварительных ферментов у молоди ленского осетра, выращиваемой на различных рационах [Текст] / З.А. Сухова, А.Н. Неваленный, А.А. Попова, С.Г. Коростелев, И.Б. Жарков // 7-ая Всес. конф. / Экологическая физиология и биохимия рыб: тез. докл. Т.2. - Ярославль, 1989. - С. 165.
4. Коростелев, С.Г. Исследование кишечной мальтазы карпа при разных температурах акклимации [Текст] / С.Г. Коростелев, В.В. Егорова // 7-ая Всес. конф. / Экологическая физиология и биохимия рыб: тез. докл. Т.1. - Ярославль, 1989. - С. 215-216.
5. Неваленный, А.Н. Действие различных рационов пищи на активность некоторых ферментов у молоди ленского осетра [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, З.А. Сухова // Всес. науч. конф. / Оценка состояния, охрана и рациональное использование биологических ресурсов водных экосистем в условиях антропогенного воздействия: тез. докл. - Ростов-на-Дону, 1990. - С. 112-114.
6. Зайцев, В.Ф. Влияние комбикормов на активность карбогидраз кишечника карпа [Текст] / В.Ф. Зайцев, А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, С.Н. Егоров // Водные биоресурсы и экология гидробионтов: сб. науч. тр. / Всесоюз. науч. иссл. ин-т прудового рыбного хоз-ва. Вып. 59. - Москва, 1990. - С. 117-118. - Библиогр.: с. 118.
7. Коростелев, С.Г. О температурных адаптациях кишечной мальтазы карповых рыб [Текст] / С.Г. Коростелев, В.В. Егорова, А.М. Уголев // Ж. эволюц. биохимии и физиол. - 1990. - Т. 26. - № 6. - С. 842-843. - Библиогр.: с. 843. - ISSN 0044-4529.
8. Коростелев, С.Г. Температурные адаптации некоторых ферментов кишечных микроворсинок карповых рыб [Текст] / С.Г. Коростелев, В.В. Егорова // XV Всес. конф. / Физиология пищеварения и всасывания: тез. докл. - Краснодар, 1990. - С. 136.
9. Коростелев, С.Г. Температурные зависимости и энергия активации мальтазы слизистой кишечника карпа, экспонированного при различных температурах среды [Текст] / С.Г. Коростелев // Краткие р-ты научной деятельности ин-та за 1989-1990 гг. / Астраханский техн. ин-т рыбной пром. и хоз-ва, Астрахань. - Москва, 1990. - С. 84-85.

10. Неваленный, А.Н. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника рыб [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, В.Ф. Зайцев // IV Всес. совещ. по рыбохозяйственному использованию теплых вод, Курчатов. - Москва, 1990. - С. 155-156.
11. Неваленный, А.Н. Динамика уровня активности карбогидраз в кишечнике белого толстолобика при изменении температуры [Текст] / А.Н. Неваленный, В.Ф. Зайцев, С.Г. Коростелев // Вопросы экологии гидробионтов: сб. науч. тр. / Всесоюзн. науч. иссл. ин-т прудового рыбного хоз-ва. Вып. 64. - Москва, 1991. - С. 69-70. - Библиогр.: с. 70.
12. Nevalyonny, A.N. Effect of water pH different values on activity of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus Carpio L.*) [Text] / A.N. Nevalyonny, V.F. Zaitsev, S.N. Yegorov, S.G. Korostelyov // Acta Ichthyologica et piscatoria. - 1991. - Vol. 21. - f. 1. - Szczecin. P. 59-63.
13. Коростелев, С.Г. Температурные адаптации кишечной мальтазы ропшинской и украинской пород карпа [Текст] / С.Г. Коростелев // VIII Науч. конф. по экол. физиол. и биохимии рыб: тез. докл. Т. 1. - Петрозаводск, 1992. - С. 162-163.
14. Коростелев, С.Г. Влияние температуры на весовые и линейные характеристики кишечника карпа [Текст] / С.Г. Коростелев, А.Н. Неваленный, В.Ф. Зайцев, С.Н. Егоров // Водные биоресурсы, воспроизводство и экология гидробионтов: сб. науч. тр. / Всесоюзн. науч. иссл. ин-т прудового рыбного хоз-ва. Вып. 66. - Москва, 1992. - С. 18-20. - Библиогр.: с. 20.
15. Неваленный, А.Н. Активность некоторых пищеварительных ферментов рыб ильмена Горчичный [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, С.Н. Егоров // Вестник Астраханского техн. ин-та рыбной пром. и хоз-ва: сб. науч. тр. Т. 1. - Москва, 1993. - С. 91-93. - Библиогр.: с. 92-93. - ISBN 85382-114-8.
16. Неваленный, А.Н. Исследование температурных характеристик кишечной  $\alpha$ -амилазы исык-кульского чебачка [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, С.Н. Егоров // Вестник Астраханского госуд. техн. ун-та: сб. науч. тр. Т. 2. - Москва, 1994. - С. 58-59. - Библиогр.: с. 59. - ISBN 85382-114-8.
17. Егорова, В.И. Активность гидролаз в кишечнике белуги в зависимости от типа использованного корма [Текст] / В.И. Егорова, С.Г. Коростелев, Л.В. Витвицкая // Межд. конф. / Каспий - настоящее и будущее: тез. докл. - Астрахань, 1995. - С. 174-175.
18. Неваленный, А.Н. Взаимодействия пищевых веществ в процессе пищеварения у рыб на примере карпа *Cyprinus carpio* [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Н. Егоров, С.Г. Коростелев // Ж. эволюц. биохимии и физиол. - 1996. - Т. 32. - №2. - С. 156-159. - Библиогр.: с. 159. - ISSN 0044-4529. ✓

19. Неваленный, А.Н. Нутритивные адаптации процесса пищеварения у осетровых рыб [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев, Л.В. Витвицкая, В.И. Егорова // Докл. акад. наук. - 1997. - Т. 352. - № 6. - С. 837-839. - Библиогр.: с. 159. - ISSN 0869-5652.
20. Неваленный, А.Н. Исследование адаптации пищеварительной функции у рыб [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Н. Егоров, С.Г. Коростелев // Первый конгресс ихтиологов России, Астрахань: тез. докл. - Москва, 1997. - С. 334-335. ISBN 5-85382-172-5.
21. Nevalyonny, A.N. *Acipenser baeri* (Brand) polysubstrate digestion in vivo and in vitro [Text] / A.N. Nevalyonny, S.G. Korostelyov // Booklet of abstracts: 3 International symposium on sturgeon. - Piacenza, Italy, 1997. - S. 266-267.
22. Неваленный, А.Н. Влияние температуры акклимации на температурные характеристики мальтазы слизистой кишечника карповых рыб [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев // Вестник Астраханского госуд. техн. ун-та: сб. науч. тр. / Экология. - Астрахань, 1994. - С. 92-95. - Библиогр.: с. 95. - ISBN 85382-114-8.
23. Nevalyonny, A.N. In vivo and in vitro polysubstrate digestion in *Acipenser baeri* (Brandt) [Text] / A.N. Nevalyonny, S.G. Korostelyov // Journal of Applied Ichthyology Blackwell Wissenschafts. - Verlag, Berlin, 1999. - Vol. 15. - № 4-5. - P. 338-339.
24. Неваленный, А.Н. Влияние модификаторов на процесс мембранного пищеварения у сибирского осетра *Acipenser baeri* [Текст] / А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев // Ж. эволюц. биохимии и физиол. - 2002. - Т. 38. - №2. - С. 185-187. - Библиогр.: с. 187. - ISSN 0044-4529.
25. Абдурахманов, Г.М. Особенности мембранного пищеварения карповых видов рыб [Текст] / Г.М. Абдурахманов, И.В. Волкова, С.Н. Егоров, В.И. Егорова, В.Ф. Зайцев, С.Г. Коростелев; отв. ред. Г.М. Абдурахманов. - М.: Наука, 2003. - 301 с.: ил.; 10 см. - Библиогр.: с. 272-299. - 500 экз. - ISBN 5-94587-035-8.
26. Коростелев, С.Г. Характеристика пищеварительных ферментов кишечника у некоторых камбаловых видов рыб, обитающих в дальневосточных морях [Текст] / С.Г. Коростелев, А.Н. Неваленный, О.Е. Левченко // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: мат. межд. конф. - Петрозаводск, 2004. - С. 70-71. - ISBN 5-9274-0145-7.
27. Левченко, О.Е. Влияние концентрации водородных ионов на активность некоторых пищеварительных ферментов лососевых видов рыб *Oncorhynchus gorbuscha* и *Salvelinus malma* [Текст] / О.Е. Левченко, А.Н. Неваленный, С.Г. Коростелев // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: мат. межд. конф. - Петрозаводск, 2004. - С. 81. - ISBN 5-9274-0145-7.
28. Levchenko, O.E. Activity Level and Temperature Correlations between Intestine  $\alpha$ -Amylase and Maltase of Mass Species of Pacific Salmon, Reproducing in the Rivers of Eastern Kamchatka

[Текст] / A.N. Nevalenny, O.E. Levchenko, S.G. Korostelev // Salmon and Marine Ecosystems in the Bering Sea and Adjacent Waters / NPAFC International Workshop "BASIS-2004" Program abstracts. - Sapporo, Hokkaido, Japan - 2004. - P. 60. - ISSN 1029-5917

29. Левченко, О.Е. Влияние модификаторов на процесс мембранного пищеварения на примере рыб семейства лососевые (*Salmonidae*) [Текст] / О.Е. Левченко, А.И. Невалянский, С.Г. Коростелев // Успехи совр. образования, 2004. - №12. - С. 89. - ISSN 1681-7494.

30. Левченко, О.Е. Влияние температуры инкубации на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов лососевых видов рыб [Текст] / О.Е. Левченко, А.И. Невалянский, С.Г. Коростелев // Естественные науки: журн. фундам. и прикладных исследований, Астрахань: сб. науч. тр. - Астрахань, 2004. - №3 (9). - С. 8-12. - Библиогр.: с. 12.

✓31. Коростелев, С.Г. Влияние температуры на пищеварительно-транспортную функцию кишечника карповых рыб [Текст] / С.Г. Коростелев, А.И. Невалянский // Вопр. ихтиологии, 2005. - Т. 45. - № 2. - С. 225-235. - Библиогр.: с. 234-235. - ISSN 0042-8752.

✓32. Коростелев, С.Г. Уровень активности и температурные зависимости  $\alpha$ -амилазы и мальтазы кишечника рыб семейства лососевых (*Salmonidae*), воспроизводимых в реках Камчатки [Текст] / С.Г. Коростелев, А.И. Невалянский, О.Е. Левченко // Изв. ТИНРО, 2005. - Т. 140. - С. 228-239. - Библиогр.: с. 238-239. - ISSN 1606-9913.

✓33. Коростелев, С.Г. Характеристика пищеварительных ферментов кишечника белокорого палтуса *Hippoglossus stenolepis* Schmidt, 1904 и звездчатой камбалы *Platichthys stellatus* (Pallas, 1788) [Текст] / С.Г. Коростелев, А.И. Невалянский, О.Е. Левченко // Биология моря, 2005. - Т. 31. - № 3. - С. 221-224. - Библиогр.: с. 224. - ISSN 0134-3475.

34. Коростелев, С.Г. Температурные адаптации кишечной мальтазы у карповых рыб [Текст] / С.Г. Коростелев // Популяционная биология, генетика и систематика гидробионтов: сб. научн. тр. ; под. ред. Н.В. Варнаевской. - Петропавловск-Камчатский, 2005. - С. 350-361. - Библиогр.: с. 360-361. ISBN 5-902210-17-8.

✓35. Левченко, О.Е. Влияние температуры инкубации на уровень активности пищеварительных ферментов кеты (*Oncorhynchus keta*) [Текст] / О.Е. Левченко, А.И. Невалянский, С.Г. Коростелев // Вестник Российского университета дружбы народов: Научный журнал. Серия экология и безопасность жизнедеятельности, 2005. - №2(12). - С. 89-92. - Библиогр.: с. 92.

Коростелёв  
Сергей Георгиевич

Особенности мембранного пищеварения у рыб различных  
таксономических и эволюционных групп.

Автореферат

Подписано в печать 16 декабря 2005 г.

Объем 22 стр. А5

Заказ от 26 декабря 2005 г.

Тираж 110.

Издательство КамчатНИРО,

683602, Петропавловск-Камчатский, ул. Набережная, 18