



005001316

Юр. Юр.

На правах рукописи

НОВИНСКИЙ ВЕНИАМИН ЮРЬЕВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У
ВЕСЛОНОСА (POLYODON SPATHULA WALBAUM)**

Специальность: 03.03.01 - Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

10 НОЯ 2011

Астрахань - 2011

Работа выполнена на кафедре «Гидробиология и общая экология»
ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет».

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор Неваленный А.Н.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Васильев А.С.

Доктор биологических наук, профессор Егоров М.А.

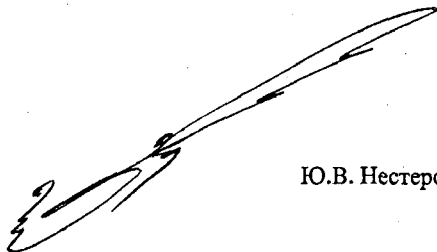
Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Южный
научный центр РАН.

Защита диссертации состоится 25 ноября 2011 г. в 10:00 на заседании
диссертационного совета ДМ 212.009.01 при Астраханском государственном
университете по адресу: 414000, Астрахань, пл. Шаумяна, 1

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке
Астраханского государственного университета по адресу: 414056 г. Астрахань,
ул. Татищева, 20а.

Автореферат разослан 20 октября 2011 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Ю.В. Нестеров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение процесса адаптации биологических систем к среде обитания является одной из главных задач современной биологии. Наиболее доступной моделью для решения ряда фундаментальных проблем адаптации является пищеварительная система, т.к. кишечник - это центральный орган, осуществляющий не только переваривание и всасывание пищи, но выполняющий и регуляторную функцию, которая связывает, с помощью мощной гормональной системы, пищеварительную систему с метаболизмом организма в целом (Адаптационно-компенсаторные процессы..., 1991; Неваленный и др., 2003). В качестве объекта для исследования адаптации процессов пищеварения удобно использовать рыб, что обусловлено исключительным разнообразием их видового состава, особенностей питания, а также экологических условий (Кузьмина, 2005).

В настоящее время на территории России действует программа по разведению веслоноса (*Polyodon spathula* Walbaum) - американского представителя отряда Осетрообразные. Отличительной особенностью вида является уникальный, по сравнению с другими осетровыми, тип питания - веслонос является зоопланктонофагом, что делает удобным его выращивание в поликультуре с другими осетровыми.

На данный момент подробно изучены биологические характеристики веслоноса (Архангельский и др., 1997; Виноградов и др., 2003), в то же время, пока в достаточной мере не были изучены особенности функционирования пищеварительной системы этого вида.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлось изучение *in vitro* влияния факторов среды и модификаторов различной природы на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса.

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

1. Исследовать влияние температуры инкубации (от 0 °С до 70 °С) на уровень активности α -амилазы, мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса.
2. Установить влияние концентрации водородных ионов в инкубационной среде на уровень активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса.
3. Исследовать влияние двухвалентных ионов шести металлов четвертого периода Периодической системы химических элементов Д.И. Менделеева (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) в концентрации 10 мг/л на уровень активности мальтазы,

казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса.

4. Изучить влияние углеводов (10 mM растворов глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы, а также эквимольного раствора глюкозы и фруктозы) и аминокислот (10 mM растворов глицина, глицил-глицина, L-аспарагина, L-лейцина, L-глутамина, L-β-фенил-α-аланина) на уровень активности мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса.

5. Сопоставить интенсивность гидролиза гомогенатами слизистой оболочки веслоноса 2% раствора мальтозы, 1% раствора казеина и 0,6 mM раствора п-нитрофенилфосфата по отдельности и в присутствии одного или двух веществ, являющихся субстратами при определении активности мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые проведено комплексное исследование особенностей процессов мембранного пищеварения у веслоноса.

Результаты исследования позволяют сделать вывод об адаптированности исследованных пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса к широким диапазонам температуры инкубации и концентрации водородных ионов.

Впервые было проведено исследование влияния модификаторов различной природы на характеристики пищеварительных гидролаз веслоноса. Продемонстрировано, что модификаторы органической и неорганической природы оказывают значительное влияние на пищеварительную функцию слизистой оболочки кишечника веслоноса, что может свидетельствовать об адаптации ферментных систем к составу пищи.

Было проведено исследование взаимодействия субстратов ферментативных реакций веслоноса в условиях *in vitro* для всех исследованных групп пищевых веществ. Установлено, что во всех случаях трисубстратных взаимодействий наблюдается только активирующий эффект.

Полученные результаты дополняют представления о характере перестроек гидролитических систем под влиянием факторов среды и в присутствии модификаторов различной природы у рыб в целом.

Практическая значимость работы. Сведения, полученные в результате исследования могут быть использованы для оптимизации условий выращивания рыб, в частности, при разработке рецептур кормосмесей для

выращивания веслоноса, что позволит точно сбалансировать содержание основных групп пищевых веществ для обеспечения максимальной эффективности гидролитического процесса.

Результаты работы включены в курс лекций по физиологии рыб и энзимологии в Астраханском государственном техническом университете.

Положения, выносимые на защиту:

1. Исследованные пищеварительные ферменты веслоноса адаптированы к широкому диапазону значений температуры и концентрации водородных ионов.

2. Ионы металлов и модификаторы углеводной и белковой природы могут достоверно изменять уровень активности пищеварительных ферментов веслоноса.

3. Одновременное присутствие 3-х субстратов в инкубационной среде всегда приводит к активации исследованных ферментативных процессов у веслоноса.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были представлены на 52-ой научной конференции профессорско-преподавательского состава Астраханского Государственного Технического Университета (Астрахань, 2008); Международной научной конференции «Молекулярные механизмы адаптаций» (Махачкала, 2008); VI Международно-практической научной конференции «Проблемы охраны окружающей среды и рационального природопользования Прикаспия и сопредельных регионов» (Элиста, 2008); Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова (Астрахань, 2008); Конференции «Современные основы формирования сырьевых ресурсов Азово-Черноморского бассейна в условиях изменения климата и антропогенного воздействия» (Ростов-на-Дону, 2008); VII Всероссийской конференции с международным участием посвященной 160-летию со дня рождения И.П. Павлова (СПб, 2009); 6 Международном симпозиуме по осетровым «Harmonizing the relationships between human activities and nature: the case of sturgeons» (Китай, Вухан, 2009); 54-ой научной конференции профессорско-преподавательского состава Астраханского Государственного Технического Университета (Астрахань, 2010); Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана» (Владивосток, 2010); VII Международной научно-практической конференции «Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики» (Тольятти, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 4 из них в изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация представлена на 136 страницах машинописного текста и иллюстрирована 29 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 5 глав с изложением результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, а также списка цитируемой литературы, включающего 191 источник, в том числе 123 работы отечественных и 68 работ иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в течение 2007-2011 гг. на кафедре «Гидробиология и общая экология» на базе ФГБОУ ВПО «Астраханского государственного технического университета».

В качестве объекта исследования были использованы сеголетки веслоноса (*Polyodon spathula* Walbaum), выращенные в искусственных условиях. В ходе работы было использовано 287 особей.

Эксперименты проводились в условиях *in vitro*. Уровень активности α -амилазы (КФ 3.1.1.1) определялся по убыли крахмала модифицированным методом Смита и Роя, уровень активности мальтазы (КФ 3.2.1.20) модифицированным глюкозооксидазным методом, щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) - по степени гидролиза *p*-нитрофенилфосфата, казеинлитическую активность протеиназ (КФ 3.4.21) в нейтральной (рН = 7.4) среде определяли модифицированным методом Ансона (Неваленный и др., 2005).

В ходе выполнения работы были использованы следующие методические подходы:

1. Определение влияния температуры на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса для мальтазы, щелочной фосфатазы и казеинлитических протеиназ проводили в диапазоне от 0 °С до 70 °С, для α -амилазы - от 0 °С до 60 °С. Шаг определения составлял 10 °С.

2. Для определения влияния концентрации водородных ионов на уровень активности ферментов веслоноса перед инкубацией в субстрате и гомогенате создавалось необходимое значение рН с помощью добавления 0,1N растворов HCl или NaOH. Для α -амилазы, мальтазы и щелочной фосфатазы был использован диапазон рН от 3.0 до 12.0, в случае с казеинлитическими протеиназами исследовался диапазон от 6.0 до 12.0. Шаг определения составлял значение 1.0.

3. При исследовании действия ионов металлов на уровень активности ферментов веслоноса в качестве источников ионов металлов использовались соответственные сернокислые соли ($MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$). Растворы этих солей добавлялись в ферментативно-активный препарат и субстрат в количестве, необходимом для создания концентрации ионов в 10 мг/л.

4. При исследовании влияния моносахаридов и аминокислот на уровень активности ферментов в качестве модификаторов были использованы 10 mM растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы, глицина, глицил-глицина, L-аспарагина, L-лейцина, L-глутамина, L-β-фенил-α-аланина, тирозина, а также эквивалентный раствор глюкозы и фруктозы. Модификаторы добавлялись в ферментативно-активный препарат и субстрат перед началом инкубации.

5. При исследовании эффектов взаимодействия пищевых веществ в процессе пищеварения использовали модель одновременного переваривания трех субстратов, против обычно используемой модели, включающей только два субстрата, что позволило создать условия, максимально приближенные к естественным, при которых происходит одновременное переваривание белков, углеводов и эфиров фосфорной кислоты. Сопоставлялась скорость гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника веслоноса 2% раствора мальтозы, 1% раствора казеина и 0,6 mM раствора п-нитрофенилфосфата по отдельности и в присутствии одного или двух веществ, не являющихся субстратом данной ферментной реакции.

Статистическая обработка полученных данных проводилась по общепринятым методикам (Глинский, Ионин, 2002). Достоверность отличий определялась с помощью критерия Стьюдента. Полученные результаты обрабатывали с помощью приложения EXCEL программы MS Office для WINDOWS XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние температуры инкубации на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса

Одним из наиболее значимых факторов для рыб является температура, ввиду того, что на пойкилотермные организмы она оказывает более выраженное воздействие, чем на гомотермные. Для пойкилотермных организмов она может определять такие показатели, как скорость развития и роста организма (Пономарев, Иванов, 2009).

Данные по влиянию температуры инкубации на уровень активности α -амилазы, мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса представлены на рис.1.

Как видно из рисунка, температурный оптимум для α -амилазы слизистой оболочки кишечника веслоноса установлен в диапазоне от 20 до 30 °С, уровень активности при 20 °С равен $11,76 \pm 0,43$ мг/г·мин; при 25 °С - $12,10 \pm 0,26$ мг/г·мин; при 30 °С - $12,10 \pm 0,17$ мг/г·мин. При 0 °С уровень активности составлял 90% от оптимума и был равен $10,91 \pm 0,59$ мг/г·мин, при 60 °С - 68% от оптимума и был равен $8,19 \pm 0,25$ мг/г·мин. Отмечена высокая термостабильность ферментативного белка, т.к. при постмаксимальных значениях температуры сохраняется до 68% активности, кроме того, и при низких температурах отмечается высокий уровень ферментативной активности относительно оптимума. Несмотря на то, что α -амилаза является ферментом панкреатического происхождения и имеет третичную структуру белка, была выявлена толерантность к широкому диапазону температур.

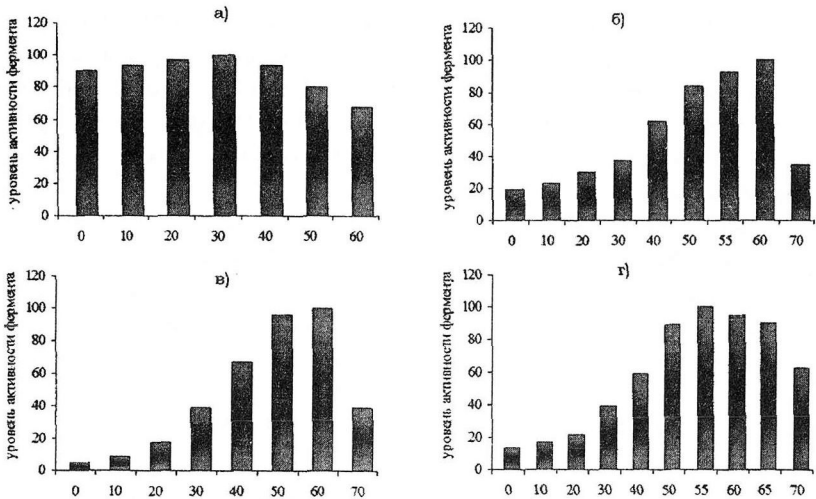


Рис 1. Влияние температуры инкубации (по горизонтали, °С) на уровень активности α -амилазы (мг/(г·мин)) (а), мальтазы (мкмоль/(г·мин)) (б), казеинлитических протеиназ (мкмоль/(г·мин)) (в) и щелочной фосфатазы (мкмоль/(г·мин)) (г) слизистой оболочки кишечника веслоноса (по вертикали в % от контроля, принятого за 100%).

Температурный оптимум для мальтазы слизистой оболочки кишечника веслоноса установлен при 60 °С; уровень активности при этом составлял

9,20±0,17 мкмоль/г·мин. Уровень активности при 0 °С составлял 19% от оптимума и был равен 1,71±0,08 мкмоль/г·мин; при 70 °С уровень активности составлял 35% от оптимума и был равен 3,22±0,06 мкмоль/г·мин. В зоне физиологических температур при 20 °С уровень активности составлял 30% от оптимума и был равен 2,79±0,15 мкмоль/г·мин. Таким образом, максимум активности отмечен при более высоких значениях температуры (55-60 °С), чем средняя температура обитания вислоноса; при постмаксимальных значениях температуры (70 °С) сохраняется 35% от оптимума, что говорит о термоустойчивости ферментативного белка исследуемого энзима. Отмечена толерантность к широкому диапазону температур.

Для казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника вислоноса температурный оптимум был установлен при 60 °С; уровень активности при этом составлял 16,98±0,12 мкмоль/г·мин. При 0 °С уровень активности фермента составлял 5% от оптимального значения и был равен 0,89±0,05 мкмоль/г·мин, при 70 °С уровень активности казеинлитических протеиназ составлял 39% от оптимального значения и был равен 9,69±0,04 мкмоль/г·мин. При 20 °С уровень активности казеинлитических протеиназ составлял 18% от оптимума и был равен 3,20±0,04 мкмоль/г·мин. Была выявлена термостабильность ферментативного белка, т.к. при постмаксимальных значениях температуры (70 °С) уровень активности ферментов оставался высоким. При низких значениях температуры (0 °С) казеинлитические протеиназы практически утрачивали активность. Тем не менее, отмечена устойчивость казеинлитических протеиназ вислоноса к широкому диапазону температур.

Температурный оптимум для щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника вислоноса установлен при значении температуры 55 °С и уровень активности при этом составил 1,87±0,02 мкмоль/г·мин. При 0 °С уровень активности составляет 14% от оптимума и равен 0,26±0,01 мкмоль/г·мин, при 70 °С уровень активности составил 63% от оптимума и равен 1,18±0,02 мкмоль/г·мин. При 20 °С уровень активности щелочной фосфатазы составляет 22% от оптимума и равен 0,41±0,02 мкмоль/г·мин. Отмечена термостабильность фермента, т.к. при постмаксимальных значениях температуры (70 °С) уровень активности исследованного фермента остается высоким. Также как и α-амилазы, мальтазы и казеинлитических протеиназ была продемонстрирована устойчивость к широким диапазонам температуры.

Таким образом, для собственнокишечных ферментов слизистой оболочки кишечника вислоноса (мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной

фосфатазы) оптимальные значения уровней активности установлены при более высоких значениях температуры (55-60 °С), чем для α -амилазы (20-30 °С), являющейся ферментом панкреатического происхождения. Кроме того, оптимальные значения для собственнокишечных ферментов выявлены при более высоких температурах, чем физиологические температуры (10-30 °С). При постмаксимальных значениях температуры уровень активности исследованных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса не опускался ниже 35% относительно оптимума, что свидетельствует об их высокой термостабильности. Продемонстрирована толерантность к широким диапазонам температур, что позволяет говорить об адаптированности исследованных ферментов веслоноса к значительным колебаниям температуры.

2. Влияние концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса

Ранее было установлено, что пищеварительные ферменты обладают наибольшей активностью в определенном диапазоне концентрации водородных ионов. 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 и др.). Следовательно, pH окружающей среды может непосредственно влиять на концентрацию водородных ионов в желудочно-кишечном тракте и соответственно, на активность ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение. При исследовании характеристик пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника большинства видов рыб отмечена довольно широкая зона оптимальных значений pH (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003).

Данные по влиянию концентрации водородных ионов на уровень активности α -амилазы, мальтазы, казеинлитических протеназ и щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, оптимальные значения pH для α -амилазы слизистой оболочки кишечника веслоноса были установлены в диапазоне pH от 7.0 до 8.0; при pH 7.0 уровень активности составлял $9,16 \pm 0,23$ мг/г·мин, при pH 8.0 - $9,49 \pm 0,23$ мг/г·мин. В зоне кислых значений pH получены следующие результаты: при pH 3.0 уровень активности составлял 30% ($2,86 \pm 0,24$ мг/г·мин) от оптимума ($9,49 \pm 0,23$ мг/г·мин); при pH 4.0 уровень активности был равен 42% ($4,01 \pm 0,31$ мг/г·мин) от оптимума; при pH 5.0 уровень активности был

равен 60% ($5,71 \pm 0,17$ мг/г·мин) от оптимального значения; при pH 6.0 уровень активности составлял 83% ($7,85 \pm 0,17$ мг/г·мин) от оптимума. В зоне щелочных значений pH получены следующие результаты: при pH 9.0 уровень активности был равен 92% ($8,75 \pm 0,17$ мг/г·мин) от оптимума; при pH 10.0 уровень активности составлял 89% ($8,48 \pm 0,11$ мг/г·мин) от оптимального значения; при pH 11.0 уровень активности был равен 86% ($8,16 \pm 0,12$ мг/г·мин) от оптимума; при pH 12.0 уровень активности был равен 69% ($6,53 \pm 0,24$ мг/г·мин) от оптимального значения. Таким образом, выявлена толерантность исследуемого фермента к широкому диапазону pH. Оптимум установлен в зоне нейтральных и слабощелочных значений.

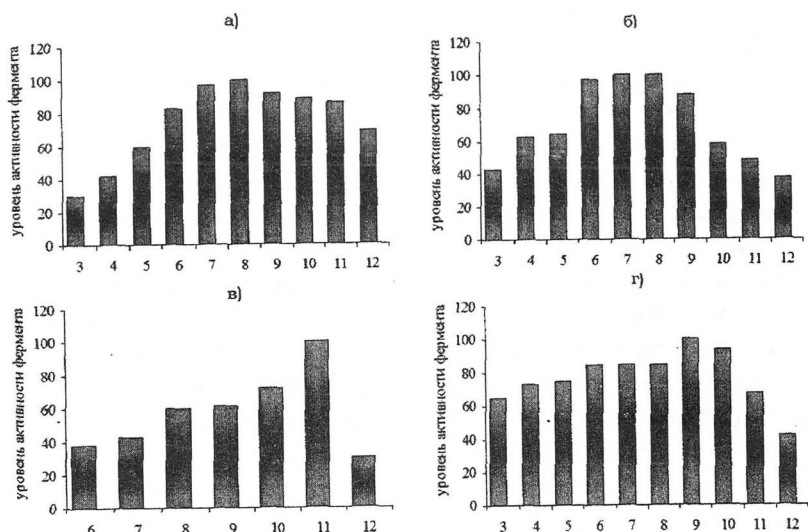


Рис 2. Влияние концентрации водородных ионов (по горизонтали) на уровень активности α-амилазы (мг/(г·мин)) (а), мальтазы (мкмоль/(г·мин)) (б), казеинлитических протеиназ (мкмоль/(г·мин)) (в) и щелочной фосфатазы (мкмоль/(г·мин)) (г) слизистой оболочки кишечника вислоноса (по вертикали в % от контроля, принятого за 100%).

Оптимальные значения для мальтазы слизистой оболочки кишечника вислоноса установлены в диапазоне pH от 7.0 до 8.0; уровень активности фермента при 7.0 и 8.0 составляет $6,93 \pm 0,14$ мкмоль/г·мин и $6,96 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин соответственно. В зоне кислых значений pH получены следующие результаты: при pH 3.0 уровень активности фермента составляет 43% от оптимума ($3,01 \pm 0,20$ мкмоль/г·мин); при pH 4.0 уровень активности

равен 63% ($4,39 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 5.0 уровень активности фермента составляет 65% от оптимума ($4,55 \pm 0,17$ мкмоль/г·мин); при pH 6.0 уровень активности фермента равен 97% ($6,72 \pm 0,17$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения. В зоне щелочных значение pH получены следующие результаты: при pH 9.0 уровень активности фермента равен 88% ($6,09 \pm 0,03$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 10.0 уровень активности фермента составляет 58% ($4,05 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения; при pH 11.0 уровень активности фермента равен 48% от оптимума ($3,34 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин); при pH 12.0 уровень активности фермента составляет 37% ($2,58 \pm 0,10$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения. Таким образом, установлена толерантность исследуемого фермента к широкому диапазону pH. Оптимум установлен при нейтральных и слабощелочных значениях pH.

Для казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника веслоноса был установлен четкий оптимум при pH 11.0 и уровень активности составлял $1,19 \pm 0,02$ мкмоль/г·мин. При pH 6.0 уровень активности был равен 38% ($0,45 \pm 0,02$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения; при pH 7.0 уровень активности был равен 43% ($0,51 \pm 0,04$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 8.0 уровень активности составил 60% ($0,71 \pm 0,04$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения; при pH 9.0 уровень активности составил 61% ($0,73 \pm 0,04$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 10.0 уровень активности был равен 72% от оптимума ($0,86 \pm 0,04$ мкмоль/г·мин); при pH 12.0 уровень активности составил 30% ($0,36 \pm 0,09$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения. Таким образом, выявлена адаптированность исследованной группы ферментов к широкому диапазону значений концентраций водородных ионов. Оптимум значительно смещен в сторону щелочных значений pH.

Для щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса оптимум был установлен при pH 9.0 и уровень активности составлял $0,48 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин. В зоне кислых значений pH были получены следующие результаты: при pH 3.0 уровень активности фермента составлял 65% ($0,31 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 4.0 уровень активности фермента был равен 73% ($0,35 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 5.0 уровень активности фермента составлял 75% ($0,36 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения; при pH 6.0 уровень активности фермента составлял 85% ($0,41 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума. В нейтральной среде (pH 7.0) уровень активности фермента составлял 85% ($0,41 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума. В зоне щелочных значений pH получены следующие результаты: при pH 8.0 уровень активности фермента был равен 85% ($0,41 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимального

значения; при pH 10.0 уровень активности фермента был равен 94% ($0,45 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 11.0 уровень активности фермента составлял 67% ($0,32 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимума; при pH 12.0 уровень активности фермента был равен 42% ($0,20 \pm 0,01$ мкмоль/г·мин) от оптимального значения. Таким образом, выявлена толерантность исследованного фермента к широкому диапазону значений концентраций водородных ионов. Оптимум смещен в сторону щелочных значений.

Таким образом, было показано, что для исследуемых ферментов веслоноса характерны различия в оптимальных значениях концентрации водородных ионов. Для α -амилазы и мальтазы оптимальные значения установлены при нейтральных и слабощелочных значениях pH; для казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы оптимальные значения смещены в сторону щелочных значений. Выявлено, что исследованные ферменты веслоноса адаптированы к широкому диапазону концентрации водородных ионов.

3. Влияние ионов металлов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса

В настоящее время значительное количество работ посвящено изучению воздействия ионов металлов на различные физиологические процессы у рыб (Чеботарева и др., 1998; Леус, Грубинко, 1998; Barnhoom et al., 1999; Jouhaud et al., 1999). В то же время, данных по воздействию ионов металлов на процессы пищеварения в кишечнике рыб недостаточно (Кузьмина, 1997; Кузьмина, Голованова, 1997; Туктаров, 2002; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004).

Ранее, при исследовании влияния ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы, было продемонстрировано, что как у осетровых, так и у карповых видов рыб в ряду Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} максимально активирующее действие оказывают металлы, находящиеся в начале периода, а максимально ингибирующее - в конце. Для мальтазы и казеинлитических протеиназ данная закономерность прослеживалась в меньшей степени (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004; Неваленный и др., 2008б).

В наших экспериментах (табл. 1) было показано, что металлы, находящиеся в начале периода (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+}) приводят к активации щелочной фосфатазы у веслоноса, а располагающиеся в конце (Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+}) - к ингибированию уровня активности. При исследовании влияния ионов металлов на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника веслоноса было установлено, что к активации ферментативной активности приводит Mn^{2+} , остальные ионы металлов или ингибируют уровень активности,

или достоверно его не изменяют. В случае с воздействием ионов металлов на казеинлитические протеиназы весплоноса нами было выявлено, что исследуемые ионы металлов либо достоверно не изменяют уровень активности ферментов, либо угнетают их активность.

Таким образом, было продемонстрировано, что наиболее выражено закономерность, отмеченная А.В. Войнаром (1960), прослеживалась при исследовании влияния ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы весплоноса.

Полученные данные об изменениях уровня активности ферментов слизистой оболочки кишечника весплоноса в присутствии металлов можно объяснить с точки зрения предположения о регуляции пищеварительной системы.

Таблица 1.

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

Фермент \ металл	Уровень активности фермента (мкмоль/(г·мин))						
	Контроль	Mn ²⁺	Fe ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
Мальтаза	4,67±0,04	5,69±0,04	4,41±0,04	4,29±0,08	4,78±0,08	4,59±0,04	4,29±0,04
Казеинлитические протеиназы	2,42±0,06	2,52±0,06	2,07±0,09	2,27±0,07	2,14±0,07	2,01±0,02	1,92±0,04
Щелочная фосфатаза	0,59±0,01	0,66±0,01	0,83±0,01	0,75±0,01	0,54±0,01	0,49±0,01	0,58±0,01

Предположение о существовании не одного, а нескольких регуляторных центров в молекулах пищеварительных ферментов, специализированных для различающихся групп эффектов, было высказано А.М. Уголевым (1985). Быстрые конформационные переходы одной формулы молекулы в другую, по мнению ряда исследователей (Уголев, Кузьмина, 1993), могут происходить в результате действия модификаторов как органической, так и неорганической природы, приводя к изменениям в уровне активности ферментов.

Второй возможный механизм взаимодействия металла с молекулой фермента, вероятно, заключается в связывании иона металла со специальной контактной площадкой (регуляторный или аллостерический центр), пространственно отделенной от активного центра (Mopod et al., 1965; Уголев, 1972) с замещением металлокомпонента некоторых энзимов (пептидазы, щелочная фосфатаза) на металл, близкий по атомному строению. Так, ионы ряда металлов, например, марганца, кобальта, цинка, способны активно подменять ионы

других металлов, в частности магний, в ряде ферментных систем (Калоус, Павличек, 1985).

Скорее всего, первый способ взаимодействия ионов металлов с ферментом лежит в основе изменения гидролитической активности такой исследуемой группы ферментов, как казеинлитические протеиназы и мальтаза. А взаимодействия второго типа характерны для щелочной фосфатазы. Однако, не исключено, что в ряде случаев мы имеем дело с эффектом положительной кооперативности, оказываемым ионами металлов, когда в результате взаимодействия олигомерной глобулы фермента с ионом металла увеличивается сродство фермента к субстрату. Следствием этого становится возросшая эффективность образования продукта реакции (Неваленный и др., 2003).

Приведенные результаты демонстрируют, что исследуемые ферменты слизистой оболочки веслоноса являются регулируемыми, т.к. способны изменять свою активность под действием металлов четвертого периода Периодической системы химических элементов Д.И. Менделеева (Mn, Fe (II), Co, Ni, Cu, Zn), причем такое влияние может быть разнонаправленным. Таким образом, используя полученные данные, представляется возможность варьировать концентрацию микроэлементов, входящих в состав премиксов в искусственные корма, для стимулирования процесса усвоения пищи у веслоноса.

4. Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса

В настоящее время продемонстрировано, что практически все собственнокисечные ферменты животных являются регулируемыми (Уголев, 1972; Кушак, 1983; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Туктаров, 2002, Неваленный и др., 2003 и др.; Бедняков, 2004). Существенное влияние на каталитические свойства ферментов могут оказывать вещества, называемые модификаторами, причем последние могут, как быть субстратами и продуктами исследуемой ферментативной реакции, так и не являться таковыми (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993).

Ранее, при исследовании влияния модификаторов углеводной и белковой природы на изменения уровня активности кишечной мальтазы было показано, что 10 mM раствор глюкозы вызывает ингибирование порядка 60% у бедуги и русского осетра от контрольного значения, у севрюги этот показатель равнялся

50%. При влиянии эквимольной смеси глюкозы и фруктозы также наблюдалось ингибирование, но менее выраженное. 10 mM раствор фруктозы не вызывал достоверных изменений в уровне активности мальтазы. Аминокислоты не вызывали достоверных изменений или увеличивали скорость гидролиза мальтазы (Бедняков, 2004).

В наших экспериментах (табл. 2) было также продемонстрировано существенное ингибирование уровня активности кишечной мальтазы везлоноса в присутствии продуктов гидролиза мальтозы. Так, 10 mM раствор глюкозы снижал уровень активности фермента на 78% от контроля, а 10 mM раствор глюкозы и фруктозы на 64%. 10 mM раствор фруктозы наоборот активировал фермент на 14%. Аминокислоты увеличивали скорость гидролиза мальтазы или не вызывали достоверных изменений.

Таблица 2.

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

	Модификатор \ фермент	Мальтаза	Казеинлитические протеиназы	Щелочная фосфатаза
Уровень активности фермента (мкмоль/(г·мин))	Контроль	4,22±0,07	0,94±0,02	0,32±0,01
	Глюкоза	0,94±0,17	0,99±0,02	0,32±0,01
	Фруктоза	4,82±0,10	0,92±0,02	0,32±0,01
	Глюкоза + фруктоза	1,54±0,10	0,90±0,07	0,32±0,01
	Сахароза	4,35±0,07	0,81±0,07	0,32±0,01
	Мальтоза	-	0,77±0,04	0,32±0,01
	Глицин	4,45±0,07	0,77±0,04	0,34±0,01
	Глицил-глицин	4,25±0,07	0,79±0,04	0,33±0,01
	L-аспарагин	4,22±0,07	0,84±0,02	0,24±0,01
	L-лейцин	4,22±0,07	0,66±0,02	0,34±0,01
	L-глутамин	4,15±0,07	0,66±0,07	0,35±0,01
	L-β-фенил-α-аланин	4,53±0,07	0,64±0,04	0,34±0,01

При исследованиях проведенных ранее, было выявлено, что при взаимодействии модификаторов с ферментами группы казеинлитических протеиназ ни один из модификаторов не вызывал достоверных изменений в уровне активности данной группы ферментов у белуги и русского осетра (Бедняков, 2004).

При исследовании влияния модификаторов углеводной и белковой природы на уровень активности казеинлитических протеиназ у везлоноса

продемонстрировано, что присутствие углеводов в гидролитической реакции достоверно изменяет уровень активности ферментов и может вызывать разнонаправленный эффект; присутствие аминокислот достоверно снижало уровень активности казеинлитических протеиназ у веслоноса.

Ранее, при исследовании действия модификаторов углеводной и белковой природы на уровень активности щелочной фосфатазы у белуги и русского осетра не было выявлено видимых закономерностей (Бедняков, 2004).

При наших исследованиях было выявлено, что углеводы не вызывают существенных изменений в уровне активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса, в то время, как присутствие аминокислот может достоверно изменять уровень активности щелочной фосфатазы, причем наблюдается разнонаправленный эффект. Таким образом, можно сделать предположения о различии регуляторных центров у веслоноса и видов, исследованных ранее.

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

Под изостерическим эффектом понимается такое изменение свойств ферментов, которое возникает в результате присоединения модификатора непосредственно к активному центру фермента, чаще всего в силу структурного сходства с субстратом. В противоположность изостерическому регулированию, под аллостерическим понимается регулирование, которое чаще всего вызывается веществом, структурно несходным с участниками ферментативной реакции. К третьему, гомостерическому, относится стереоспецифическое ингибирование L-фенилаланином щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника крыс (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993).

В случае с достоверным ингибирующим действием глюкозы на уровень активности мальтазы у всех исследованных нами видов рыб мы, скорее всего, имеем дело с изостерическим эффектом, поскольку продукт реакции является структурным аналогом субстрата, вследствие чего может присоединяться к активному центру фермента и вызывать ингибирование конкурентного типа (Уголев, 1972). Данное явление ретроингибирования впервые было описано Новиком и Сцилардом (Novic, Szilard, 1954) и Умбаргером (Umbarger, 1956; Умбаргер, 1954), показавшим, что в цепи ферментативных реакций конечный

продукт нередко является ингибитором фермента, катализирующего начальный этап процесса. В результате этого возникает отрицательная обратная связь, поддерживающая постоянство скоростей реакций, которые обеспечиваются данной ферментативной цепью (гомеорезис).

Кроме того, были выявлены эффекты как активации, так и конкурентного ингибирования аминокислотами пищеварительных ферментов веслоноса. Механизм такого действия стоит отнести к аллостерическому типу. Данные влияния объясняются явлением индуцированного соответствия (Koshland, 1964; Кошланд, 1967). Так субстрат-регулятор (модификатор) осуществляет изменение ферментативной активности, не являясь субстратом соответствующего фермента и регуляция осуществляется за счет связывания модификатора в пункте пространственно не совпадающем с активным центром (Уголев, 1972, 1985).

Таким образом, было продемонстрировано, что мальтаза, казеинлитические протеиназы и щелочная фосфатаза слизистой оболочки кишечника веслоноса является регулируемыи, способны изменять свою активность под действием модификаторов углеводной и белковой природы, кроме того, было выявлено, что такое влияние может иметь разнонаправленный эффект.

5. Эффекты взаимодействия пищевых веществ в слизистой оболочке кишечника веслоноса в условиях *in vitro*

В реально протекающем гидролитическом процессе происходит одновременное переваривание белков, жиров и углеводов, поэтому возникает вопрос о взаимном влиянии данных веществ друг на друга в процессе пищеварения. В настоящее время эффекты взаимодействия на уровне субстратов мембранного пищеварения достаточно подробно изучены на высших животных (Уголев, 1972; Кушак, 1983), кроме того, имеются сведения и о взаимодействии таких веществ в процессе гидролиза у рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный, 1996; Неваленный, Коростелев, 2002; Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004).

Ранее, при исследовании интенсивности гидролиза гомогенатами слизистой оболочки кишечника осетровых, лососевых, карповых, щуковых, окуневых и камбаловых были выявлены эффекты взаимодействия субстратов ферментативных реакций (Неваленный и др., 2003; Бедняков, 2004; Коростелев, 2005). В результате проведенных исследований было показано, что при бисубстратном воздействии одно и то же вещество может быть одновременно

активатором для одного ферментативного процесса и ингибитором для другого. Но наиболее интересен тот факт, что эффекты трисустратного пищеварения не являлись суммой бисустратных эффектов, более того, они могли иметь противоположную направленность. Стоит особенно отметить, что в случае с трисустратным взаимодействием, абсолютно во всех проведенных ранее экспериментах был обнаружен только активирующий эффект.

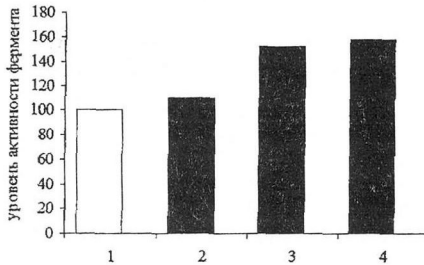


Рис. 3. Уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника веслоноса в присутствии дополнительных субстратов (По вертикали - в % от контроля. По горизонтали: 1 - контроль; 2 - 0,6 мМ п-нитрофенилфосфат; 3 - 1% казеин; 4 - 0,6 мМ п-нитрофенилфосфат + 1% казеин).

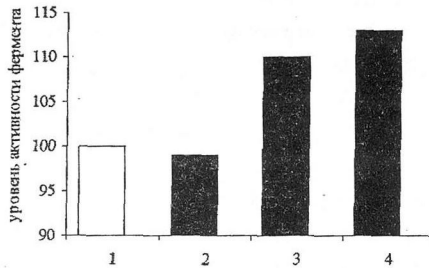


Рис. 4. Уровень активности казеинлитических протеиназ слизистой оболочки кишечника веслоноса в присутствии дополнительных субстратов (По вертикали - в % от контроля. По горизонтали: 1 - контроль; 2 - 2% мальтоза; 3 - 0,6 мМ п-нитрофенилфосфат; 4 - 2% мальтоза + 0,6 мМ п-нитрофенилфосфат).

Исследование би- и трисустратных эффектов, проведенное на пищеварительных ферментах слизистой оболочки кишечника веслоноса (рис. 3-5), только подтвердило описанную выше общую закономерность: в случае бисустратных взаимодействий наблюдался разнонаправленный эффект, при одновременном присутствии трех субстратов отмечалась только активация

ферментативного процесса, что, вероятно, свидетельствует об общности данной закономерности для пищеварительной системы рыб.

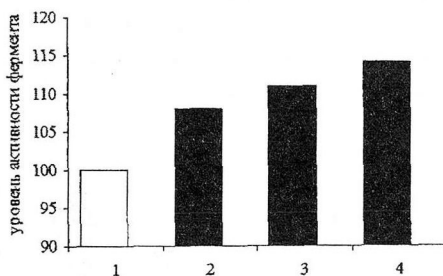


Рис. 5. Уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса в присутствии дополнительных субстратов (По вертикали - в % от контроля. По горизонтали: 1 - контроль; 2 - 2% мальтоза; 3 - 1% казеин; 4 - 2% мальтоза+1% казеин).

Таким образом, нами были продемонстрированы особенности адаптации некоторых пищеварительных ферментов веслоноса к действию абиотических факторов среды и модификаторов различной природы, что существенно дополняет полученные ранее данные по адаптации пищеварительной системы у рыб, а также позволит эффективнее производить выращивание веслоноса в искусственных условиях.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании влияния температуры инкубации, концентрации водородных ионов, ионов металлов, модификаторов углеводной и белковой природы на уровень активности ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса установлено наличие индивидуальных адаптаций пищеварительного процесса.
2. Установлено, что исследуемые ферменты веслоноса адаптированы к широким значениям температуры и сохраняют свою активность как при постмаксимальных (70 °C), так и при минимальных (0 °C) значениях температуры. При исследовании влияния температуры инкубации на уровень активности мальтазы, казеинлитических протеиназ и щелочной фосфатазы, осуществляющих процессы мембранного пищеварения у веслоноса установлено, что оптимальные значения уровня активности

расположены в диапазоне температур от 55 до 60 °С; оптимум уровня активности α -амилазы располагается в диапазоне от 20 до 30 °С.

3. Выявлено, что оптимальные значения уровня активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса расположены в диапазоне значений рН от 7.0 до 11.0. Продемонстрировано, что исследованные пищеварительные ферменты веслоноса обладают устойчивостью к широкому диапазону рН.
4. Установлено достоверное ($p < 0,05$) изменение уровня активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника веслоноса в условиях *in vitro* в присутствии ионов металлов. Показано, что ответная реакция фермента веслоноса зависит от положения металла в Периодической системе химических элементов Д. И. Менделеева: активирующее действие оказывают металлы, находящиеся в начале периода (Mn, Fe (II), Co), ингибирующее - в конце (Ni, Cu и Zn).
5. При исследовании ферментативно-активных препаратов слизистой оболочки кишечника веслоноса установлено, что в случае бисубстратного взаимодействия одно и то же вещество может служить активатором для одного ферментативного процесса и ингибитором для другого, в то время как в присутствии трех субстратов в инкубационной среде отмечается только активирующий эффект.
6. Показано, что уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника веслоноса существенно снижается в присутствии продуктов гидролиза мальтозы (около 70%), что свидетельствует о наличии явления ретроингибирования.
7. Продемонстрировано, что исследованные ферменты слизистой оболочки кишечника веслоноса способны изменять свою активность под действием модификаторов углеводной и белковой природы, т.е. являются регулируемыми. Показано, что эффект от присутствия в среде инкубации модификаторов может быть разнонаправленным.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Научные статьи, опубликованные в рецензируемых журналах,
входящих в реестр ВАК РФ:**

1. Температурные адаптации ферментов слизистой оболочки кишечника некоторых представителей отряда *Asipenceriformes* / Бедняков Д.А., Неваленный А.Н., Новинский В.Ю. // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 3. Экономика, Экология. №1. 2009. С.244-247.
2. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса *Polyodon Spathula* / Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Новинский В.Ю. // Вопросы ихтиологии. Т.50. №3. 2010. С.400-404.
3. Исследование некоторых характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса и русского осетра / Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Новинский В.Ю. // Юг России. Экология, развитие. № 4. 2010. С.66-70.
4. Влияние модификаторов на пищеварительные гидролазы у рыб различных систематических групп / Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Коростелев С.Г. // Вопросы ихтиологии. Т.51. №3. 2011. С.1-6.

Научные статьи и материалы научных конференций:

5. Исследование уровня активности мальтазы слизистой оболочки кишечника осетровых видов и их гибридов / Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Володин В.А., Неваленный А.Н. // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб, 2008. С.18.
6. Влияние температуры и концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса (*Polyodon spathula Walbaum*) / Новинский В.Ю., Бедняков Д.А., Володин В.А., Неваленный А.Н. // Тезисы докладов VI Всероссийской конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб, 2008. С.157.
7. Сопоставление уровней активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника белуги (*Huso huso L.*) и

- веслоноса (*Polydore spathula* W.) / Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Володин В.А., Неваленный А.Н. // Сборник статей международной научной конференции «Молекулярные механизмы адаптаций». Махачкала, 2008. С.53-55.
8. Влияние температуры на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов слизистой кишечника веслоноса (*Polydore spathula* W.) и белуги (*Huso huso* L.) / Новинский В.Ю., Бедняков Д.А., Володин В.А., Неваленный А.Н. // Сборник материалов международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии». М, 2008. С.63-64.
9. Влияние ионов некоторых металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника гибрида стерляди и белуги (стербель) / Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Володин В.А. // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова. Астрахань, ООО «КПЦ «ПолиграфКом», 2008. С.183-185.
10. Особенности адаптации некоторых пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника веслоноса к различным уровням концентрации водородных ионов / Новинский В.Ю. // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения К.В. Горбунова. Астрахань, ООО «КПЦ «ПолиграфКом», 2008. С.188-190.
11. Влияние температуры и концентрации водородных ионов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника севрюги (*Acipenser stellatus*) и русского осетра (*Acipenser guldenstadtii*) / Бедняков Д.А., Володин В.А., Новинский В.Ю., Неваленный А.Н. // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения и рационального использования биоразнообразия Прикаспия и сопредельных регионов». Элиста: КалмГУ, 2009. С.116-117.
12. Влияние ионов металлов на уровень активности щелочной фосфатазы слизистой оболочки кишечника осетрообразных рыб и их гибридов / Бедняков Д.А., Неваленный А.Н., Новинский В.Ю. // Тезисы докладов VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 2009. С.50-51.
13. Влияние углеводов и аминокислот на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника представителей семейства *Acipenseriformes* / Неваленный А.Н., Бедняков Д.А., Новинский В.Ю. //

- Бюллетень Московского общества естествоиспытателей природы. Отдел биологический. Т.114. Вып.3. Приложение 1. Часть 2. 2009. С.102-105.
14. Влияние концентрации водородных ионов на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов белуги, стерляди и их гибрида (бестера) / Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Неваленный А.Н. // Материалы международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана». Владивосток: Дальрыбвтуз, 2010. Ч.1. С.25-28.
 15. Влияние ионов металлов на уровень активности мальтазы слизистой оболочки кишечника русского осетра, ленского осетра и их гибрида / Бедняков Д.А., Новинский В.Ю., Неваленный А.Н. // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики». Сборник «Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды». Тольятти: Волжский университет им. В.Н. Татищева, 2010. С.17-19.
 16. Влияние температуры на уровень активности некоторых пищеварительных ферментов белуги / Новинский В.Ю., Бедняков Д.А., Неваленный А.Н. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы современной науки и образования». Биологические науки. Т.11. Уфа: РИЦ БашГУ, 2010. С.468-470.
 17. Исследование особенностей характеристик ферментов, обеспечивающих процесс мембранного пищеварения у веслоноса / Неваленный А.Н., Новинский В.Ю., Бедняков Д.А. // Тезисы докладов XXI Съезда физиологического общества имени И.П. Павлова. Калуга: Типография ООО «БЭСТ-принт», 2010. С.433.
 18. Researches into processes of membrane digestion in paddlefish *Polyodon spathula* Walbaum / Nevalennyu A.N., Novinsky V. Yu. // Book of abstracts of 6th International symposium on sturgeon. "Harmonizing the relationships between human activities and nature: the case of sturgeons". Wuhan, 2009. P.17-18.