

ISSN 0320-3557

Российская академия наук

Труды Института биологии
внутренних вод имени И.Д. Папанина
Российской академии наук
Выпуск 72 (75), 2015



ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК



ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМЕНИ И.Д. ПАПАНИНА РАН



Труды ИБВВ РАН, вып. 72 (75), 2015

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

УДК 591.1(063) + 591.05(063)
ББК 28.69
Ф50

Физиология и биохимия водных животных / [отв. ред. Г. М. Чуйко]. — Ярославль : Канцлер, 2015. — 133 с. — (РАН, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина. Труды ; вып. 72(75), 2015).

А. М. Андреева, Д. В. Гарина, В. К. Голованов, И. Л. Голованова, Е. И. Головкина, Е. Г. Евдокимов, Е. А. Заботкина, Д. С. Капшай, В. Т. Комов, В. В. Кузьмина, Т. Б. Лапирова, Л. Н. Лапкина, А. С. Маврин, В. И. Мартемьянов, П. В. Меньшакова, Т. А. Нестерова, И. А. Парфенова, В. А. Подгорная, И. П. Рябцева, В. Е. Середняков, А. К. Смирнов, А. А. Солдатов, Г. А. Урванцева, Р. А. Федоров, А. А. Филиппов, Г. М. Чуйко

В выпуск вошли статьи, относящиеся к разделу экологии — аутоэкология, которые касаются различных направлений экологической физиологии и биохимии водных животных, изучающей зависимость функционирования организма водных животных от условий среды их обитания и раскрывающей физиолого-биохимические основы адаптации организма к природным и антропогенным факторам. В статьях рассматриваются вопросы организации белковых комплексов плазмы, экологической пластичности гематологических показателей, процессов пищеварения в норме и при накоплении ртути, биохимических механизмов регуляции термоизбирательного и пищевого поведения, температурных оптимумов и верхних температурных границ жизнедеятельности, кислородного режима скелетных мышц в условиях экспериментальной гипотермии, физиологических механизмов регуляции водного гомеостаза при адаптации к факторам среды, формирования водно-солевого состава костной ткани, сезонной динамики и свойств холинэстераз пресноводных и морских гидробионтов.

Книга рассчитана на экологов, гидробиологов, физиологов, биохимиков, специалистов в области природопользования и охраны природных ресурсов, студентов биологических и экологических факультетов.

Ответственный редактор тома
доктор биологических наук, *Г. М. Чуйко*

Рецензенты:

Член-корр. РАН, профессор *Н. Н. Немова*
Доктор биологических наук, профессор *О. Н. Лукьянова*

Редакционная коллегия Трудов ИБВВ РАН:

С. А. Поддубный (главный редактор) *А. Н. Дзюбан*
А. В. Крылов (зам. главного редактора) *В. Т. Комов*
А. А. Бобров *В. И. Лазарева*
В. К. Голованов *Н. М. Минеева*

Печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН

Physiology and Biochemistry of Aquatic Animals / [Editor-in-chief G. M. Chuiko]. — Yaroslavl : Kancler, 2015. — 133 p. Transactions of I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences, issue 72(75), 2015.

A. M. Andreeva, G. M. Chuiko, D. V. Garina, V. K. Golovanov, I. L. Golovanova, E. I. Golovkina, E. G. Evdokimov, R. A. Fedorov, A. A. Filippov, D. S. Kapshay, V. T. Komov, V. V. Kuz'mina, T. B. Lapirova, V. I. Martem'yanov, A. S. Mavrin, P. V. Men'shakova, T. A. Nesterova, I. A. Parfenova, V. A. Podgornaya, I. P. Ryabtseva, V. E. Serednyakov, A. K. Smirnov, A. A. Soldatov, G. A. Urvantseva, E. A. Zabotkina.

The issue includes articles related to the section of ecology — autecology that address different areas of environmental physiology and biochemistry of aquatic animals, studying the dependence of the functioning of aquatic animal organism on the conditions of their environment, and revealing the physiological and biochemical basis of adaptation of organism to natural and anthropogenic factors. The articles deal with the organization of plasma protein complexes, ecological plasticity of hematological parameters, patterns of digestion under normal conditions and at mercury bioaccumulation, biochemical mechanisms of regulation thermo selective and feeding behavior, temperature optima and the upper temperature of life boundaries, oxygen regime of skeletal muscle under conditions of experimental hypothermia, physiological mechanisms of water homeostasis regulation at adapting to environmental factors, the formation of water-salt composition of bone, seasonal dynamics and properties of cholinesterase in freshwater and marine aquatic organisms.

The book is intended for ecologists, hydrobiologists, physiologists, biochemists, specialists in the field of wildlife management and preservation of natural resources, students of biological and environmental departments.

Editor-in-chief of the volume
Doctor of biological sciences *G. M. Chuiko*

Reviewers:

Corresponding member of RAS, professor *N. N. Nemova*
Doctor of biological sciences, professor *O. N. Lukyanova*

Editorial board of IBIW RAS Transactions:

S. A. Poddubny (editor-in-chief) *A. N. Dzyuban*
A. V. Krylov (deputy chief editor) *V. I. Lazareva*
A. A. Bobrov *V. T. Komov*
V. K. Golovanov *N. M. Mineeva*

Published by the decision of IBIW RAS Academic council

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Андреева А.М., Рябцева И.П., Федоров Р.А.</i> Организация белковых комплексов плазмы у костистых рыб.....	5
<i>Заботкина Е.А., Лапирова Т.Б., Середняков В.Е., Нестерова Т.А.</i> Экологическая пластичность гематологических показателей пресноводных костистых рыб.....	16
<i>Кузьмина В.В.</i> Закономерности процессов пищеварения у рыб Рыбинского водохранилища (обзор).....	30
<i>Голованова И. Л., Голованов В.К.</i> Пищеварительные гликозидазы рыб в условиях повышения температуры среды (обзор)..	50
<i>Голованова И.Л., Филиппов А.А., Комов В.Т., Урванцева Г. А, Евдокимов Е.Г.</i> Влияние накопленной ртути на активность гликозидаз и их чувствительность к действию тяжелых металлов у головастиков серой жабы.....	60
<i>Гарина Д.В., Кузьмина В.В., Смирнов А.К., Меньшакова П.В.</i> Роль серотонина и холецистокинина в регуляции термоизбирательного и пищевого поведения у рыб.....	66
<i>Голованов В.К., Капшаев Д.С.</i> Сравнительный анализ температурного оптимума и верхней температурной границы жизнедеятельности у молоди рыб, обитающих в водоемах Верхней Волги.....	80
<i>Солдатов А.А., Парфенова И.А.</i> Кислородный режим скелетных мышц кефали-сингиля (<i>Liza aurata</i> Risso) в условиях экспериментальной гипотермии.....	91
<i>Мартемьянов В. И.</i> Физиологические механизмы регуляции водного гомеостаза у пресноводных гидробионтов при адаптации к факторам среды.....	99
<i>Маврин А.С., Мартемьянов В.И.</i> Содержание натрия, калия, кальция, магния и воды в костной ткани впервые созревших самок плотвы <i>Rutilus rutilus</i> L. с гонадами IV стадии зрелости в разные годы.....	111
<i>Чуйко Г.М., Головкина Е.И., Подгорная В.А.</i> Сезонная динамика активности ацетилхолинэстеразы и содержания белка в различных отделах головного мозга пресноводной костистой рыбы <i>Abramis brama</i> L. из Рыбинского водохранилища.....	117
<i>Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М., Подгорная В.А.</i> Свойства холинэстеразы пиявки <i>Caspiobdella fadejewi</i> Epstein (Piscicolidae, Rhynchobdellida).....	126

CONTENTS

<i>Andreeva A. M., Ryabtseva I. P., Fedorov R. A.</i> Organization of plasma protein complexes in bony fish.....	5
<i>Zabotkina E. A., Lapirova T. B., Serednyakov V. E., Nesterova T. A.</i> Ecological plasticity of hematological parameters of freshwater bony fish.....	16
<i>Kuzmina V. V.</i> The regularities of digestion processes in fish from the Rybinsk reservoir (Review).....	30
<i>Golovanova I. L., Golovanov V. K.</i> Digestive glycosidase of fish under increasing water temperature (Review).....	50
<i>Golovanova I. L., Filippov A. A., Komov V. T., Urvantseva G. A., Evdokimov E. G.</i> Effect of mercury accumulation on the activity of glycosidase and their sensitivity to heavy metals in toad tadpoles.....	60
<i>Garina D. V., Kuz'mina V. V., Smirnov A. K., Men'shakova P. V.</i> The role of serotonin and cholecystokinin in the regulation of the regulation of thermo preferential and feeding behavior of fish.....	66
<i>Golovanov V. K., Kapshay D. S.</i> Comparative analysis of the temperature optimum and upper temperature limit for vital activity in the young fish from the water bodies of Upper Volga.....	80
<i>Soldatov A. A., Parfenova I. A.</i> The oxygen regime of the skeletal muscles of the mullet (<i>Liza aurata</i> Risso) at experimental hypothermia.....	91
<i>Martemyanov V. I.</i> Physiological mechanisms of regulation of water homeostasis in freshwater organisms at adaptation to ecological factors.....	99
<i>Mavrin A. S., Martem'yano V. I.</i> The content of sodium, potassium, calcium, magnesium, and water in bone tissue of first ripening female of roach <i>Rutilus rutilus</i> L. with gonads at maturity stage IV in different years.....	111
<i>Chuiko G. M., Golovkina E. I., Podgornaya V. A.</i> Seasonal dynamics of acetylcholinesterase activity and protein content in various parts of brain in freshwater bony fish <i>Abramis brama</i> L from the Rybinsk reservoir.....	117
<i>Lapkina L. N., Chuiko G. M., Podgornaya V. A.</i> Substrate-inhibitor analysis of cholinesterase of freshwater leech <i>Caspiobdella fadejewi</i> Epstein (Piscicolidae).....	126

ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЛАЗМЫ У КОСТИСТЫХ РЫБ

А. М. Андреева, И. П. Рябцева, Р. А. Федоров

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru*

Исследовали организацию низкомолекулярной фракции плазмы и белковые комплексы в её составе у пресноводных и морских костистых рыб. С помощью MALDI в составе фракции идентифицированы гемопексины, негомологичные аполипопротеины и ингибиторы сериновых протеиназ. У пресноводных рыб белковые комплексы были организованы единообразно – из олигомерных форм гемопексина и аполипопротеинов. Весной комплексы из олигомеров перестраивались в комплексы из мономерных форм этих белков. У морских видов имело место разнообразие в организации НМ-фракций плазмы. Их белковые комплексы отличались по составу от комплексов “пресноводного” типа и обнаружены не у всех морских видов, возможно, по причине отсутствия у некоторых из них аполипопротеинов. Обсуждается участие белковых комплексов плазмы в стабилизации обменных процессов в организме рыб. Предполагается, что организацию протеома плазмы и белковых комплексов в его составе определили особенности становления внутренней жидкой среды организма в эволюции рыб.

Ключевые слова: костистые рыбы, плазма, белки, MALDI

ВВЕДЕНИЕ

Одной из особенностей протеома плазмы рыб является присутствие в нем белковых комплексов из олигомеров транспортных белков в составе низкомолекулярной фракции (Андреева и др., 2015a). Протеом плазмы активно исследуется у разных видов рыб (Tsai et al., 2004; Lucitt et al., 2008; Babaei et al., 2013; Braceland et al., 2013; Low et al., 2013; Dietrich et al., 2014). За редким исключением, он включает в себя практически все характерные для позвоночных белковые семейства (Андреева, 2012). Использование современных подходов в его исследовании (2D- электрофорез, трипсинолиз, хроматография, масс-спектрометрия MALDI) позволило обнаружить в его составе до тысячи и более полипептидов – продуктов отдельных генов, как у высших позвоночных – млекопитающих (Anderson et al., 2004), так и у низших - рыб (Babaei et al., 2013).

Белковые комплексы обнаружены в плазме только у представителей низших таксонов, например, у *Teleostei* и *Elasmobranchii* (Андреева, Федоров, 2010; Андреева и др., 2015b). В плазме млекопитающих в норме они отсутствуют; их появление сопутствует, как правило, ряду заболеваний, в том числе, нейродегенеративным патологиям (Margulis et al., 2006; Lazarev et al., 2013) и диабету (Ali Han et al., 2007).

Известно, что белки-олигомеры эффективно регулируют осмотическое давление жидкости внутри клетки. Между тем, участие внеклеточных олигомерных белков в осморегуляции считается проблематичным из-за возможной “утечки” низкомолекулярных полипептидных цепей из внутрисосудистого пространства в интерстициальное (Шульц, Ширмер, 1982). У пресноводных *Teleostei* содержание белковых комплексов в плазме достигает 20% и выше (Андреева, 2010), и физиологическая целесообразность их присутствия в крови остается загадкой. Цель настоящего исследования – сравнительный анализ организации низкомолекулярных фракций плазмы и поиск в их составе белковых комплексов у пресноводных и морских костистых рыб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали костистых морских и пресноводных рыб:

– султанку (барабульку) *Mullus barbatus*, звездочета *Uranoscopus scaber*, морского ерша (скорпену) *Scorpaena porcus* L., бычка кругляка *Neogobius melanostomus* P. и мартовика *Mesogobius batrachocephalus* P., морского налима *Gaidropsarus mediterraneus* L., зеленушку *Symphodus tinca* L. (Черное море); речную камбалу *Platichthys flesus*, лиманду *Limanda limanda*, зубатку *Anarhichas lupus*, треску *Gadus morhua*, бычка керчака *Muchocephalus scorpius* (Белое море);

– щуку *Esox lucius* L., судака *Stizostedion lucioperca* L., окуня *Perca fluviatilis* L., карпа *Cyprinus carpio* L., леща *Abramis brama* L., синца *Abramis ballerus* L., плотву *Rutilus rutilus* L., карася серебряного *Carassius auratus* L. (Рыбинское водохранилище, р.Волга).

Кроме диких видов в работе использовали карпа *Cyprinus carpio* L, содержащегося в экспериментальных прудах ИБВВ РАН. В экспериментах по акклимации пресноводных рыб к условиям повышенной солености использовали лещей, подрощенных на экспериментально-прудовой базе ИБВВ РАН. Половозрелых лещей отлавливали в мае в р.Волга; далее потомство, полученное в результате

естественного нереста производителей в экспериментальных нерестовых прудах, подращивали в нагульных прудах до 2+.

Определение стадии зрелости гонад. Стадии зрелости гонад половозрелых рыб определяли по шкале зрелости половых продуктов (Сакун, Буцкая, 1968).

Получение плазмы крови рыб. Кровь отбирали из хвостовых сосудов рыб сразу после их отлова. Для получения плазмы кровь собирали в пробирки с 1%-ным раствором (*m/V*) гепарина, осевшие эритроциты удаляли центрифугированием при комнатной температуре в течение 10 мин при 14 000 *g*.

Получение тканевой жидкости. Мышечную жидкость отбирали выше боковой линии между краем жаберной крышки и спинным плавником. С помощью ножниц с длинными лезвиями делали кожный разрез и микронаконечником дозатора оттягивали кожу в глубине «кармана» так, чтобы создать в нём разрежение. Благодаря «подсасывающему» эффекту этого разрежения мышечная жидкость собиралась в «кармане» в количестве нескольких микролитров, которые отбирали для анализа. При необходимости использовали «бумажный метод» отбора мышечной жидкости (Андреева и др., 2015b). Перед электрофорезом образцы ТЖ центрифугировали.

Электрофоретические методы. НМ-фракцию оценивали по числу белков, молекулярной массе MW и электрофоретической подвижности *Rf* белков, и расположению на электрофореграмме в 7.5%-ном ПААГ.

Способ организации (мономер/олигомер) белков определяли по расположению, числу и молекулярной массе (MW) «пятен» белков в неденатурирующем 2D-электрофорезе (2D-E) в градиенте концентраций 5–40% ПААГ и денатурирующем электрофорезе — в 11%-ном ПААГ с 8 М мочевиной (Creighton, 1979) и 12.5%-ном Ds-Na-ПААГ в восстанавливающих условиях (Laemmli, 1970). В первом направлении проводили диск-электрофорез в 7.5- или 4.9%-ном ПААГ.

В качестве маркеров MW использовали полимеры сывороточного альбумина человека HSA (67, 134, 201, 268, 335 кДа) и овальбумина OA (45, 90, 135 кДа) и PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (11, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 кДа) (Fermentas). Денситометрирование, расчет относительного содержания и MW белков проводили с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 (Scanalytic Inc.).

Экспериментальная акклимация неполовозрелых лещей к условиям повышенной солености воды. Для исключения влияния фактора созревания гонад на капиллярную фильтрацию использовали неполовозрелых лещей возраста 2+, полученных в результате естественного нереста производителей и подрошенных в экспериментальных прудах. Рыб акклимировали к воде различной солености — 8, 10 и 11.5‰ в соответствии с рекомендациями по акклимации пресноводных рыб в диапазоне “критической солености” (Хлебович, 1974; Мартемьянов, 1989), добавляя соль NaCl в аквариумы в расчете 1 г/л в сутки. В контрольный аквариум соль не добавляли. В аквариумах поддерживали устойчивый температурный и гидрохимический режим.

Масс-спектрометрия MALDI. Операции по подготовке проб анализируемых белков для масс-спектрометрии выполнены в соответствии с протоколом, описанным ранее (Андреева и др., 2015a,b). Масс-спектры (*ms*) продуктов трипсинолиза получали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex™ BRUKER (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона в диапазоне масс 700–4500 *m/z*. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 50 ppm. При необходимости получали спектры фрагментации *ms-ms* отдельных пептидов. Для их получения использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного пакета FlexAnalysis 2.4 (“Bruker Daltonics”, Германия).

Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot (опция “пептидный фингер-принт”, www.matrixscience.com). Поиск проводили в DB NCBI среди белков всех организмов и/или EST vertebrates. Кандидаты, имеющие параметр достоверности *score*>83, считали определенными надежно (*p* < 0.05). С использованием ПО Biotoools 3.0 (“Bruker Daltonics”, Германия) проводили поиск кандидатов по объединенным данным *ms+(ms-ms)*. Если кандидатные последовательности обнаруживались в неаннотированной базе данных EST в виде библиотек кДНК, то реконструированную на основе мРНК аминокислотную последовательность вставляли в Protein BLAST и далее задавали поиск кандидатного белка среди белков всех позвоночных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Организация НМ- фракции белков плазмы у пресноводных рыб.

В диск-Е белков плазмы низкомолекулярная фракция (НМ-фракция) располагается ниже бэта-глобулинов трансферринов, специфически окрашивающихся реактивом Мюллера (Андреева и др., 2015a,b) (рис.1, табл.1).

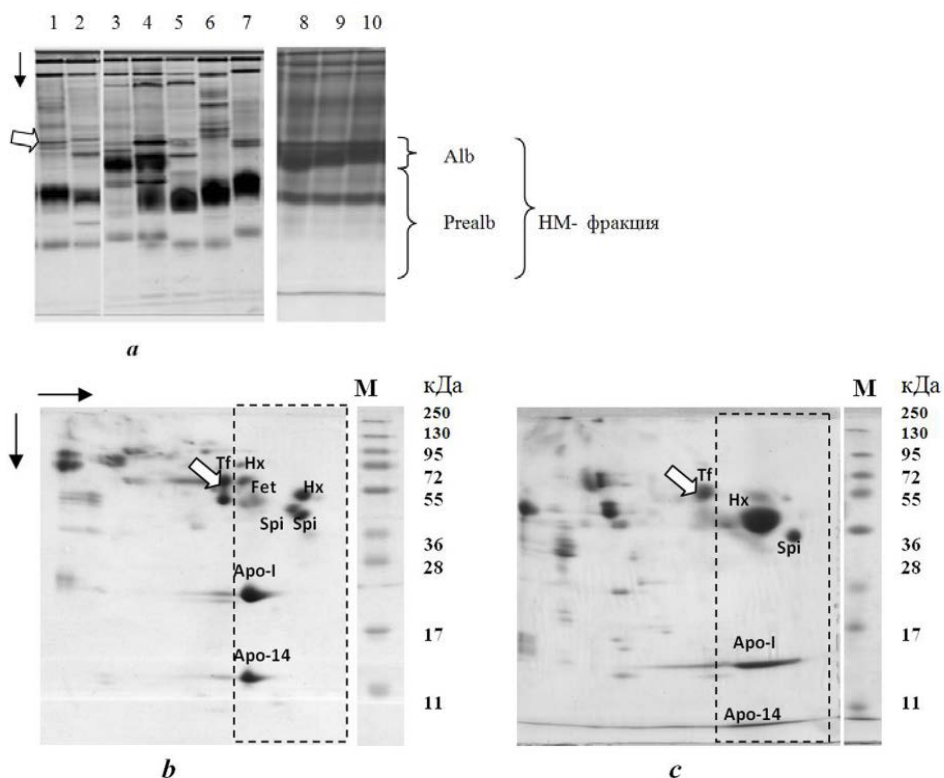


Рис.1. Разделение белков плазмы рыб в диск-Е (а) и 2D-SDS-Е (восстанавливающие условия) (b,c): а- леща (1, 2), синца (3, 4), уклей (5), чехони (6), густеры (7), карпа (8-11); б - карпа; с - щуки. М - PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Белки НМ-фракции выделены пунктиром. “Alb” и “Prealb” - подфракции. Tf, Hx, Fet, Spi, Apo-I, Apo-14 – белки НМ-фракции. Белая стрелка указывает на трансферрин. Пояснения в тексте.

У всех исследованных видов НМ-фракции были организованы единообразно – из двух подфракций. Первая содержала доминирующий белок, на долю которого приходилось свыше 20% всего белка плазмы. На электрофореграмме он имел вид большого пятна. Специфическое связывание доминирующим белком альбуминспецифичного красителя синего Эванса (Андреева и др., 2015a,b) позволило считать его альбуминоподобным и обозначать далее как подфракцию Alb в неденатурирующем электрофорезе (рис.1). Вторая подфракция состояла из более подвижных в электрическом поле по сравнению с Alb белков. По аналогии с белками млекопитающих мы обозначили их как преальбумины (Prealb). Такая структура НМ-фракции была характерна не только для карповых, но и для щук и окуневых рыб.

В 2D-SDS-Е структура НМ-фракции у всех исследованных видов была единой. Фракция вплотную примыкала к белку “навигатору” - трансферрину (рис.1, табл.1).

2. Идентификация белков НМ- фракции плазмы пресноводных видов на примере карпа.

Идентификацию белков НМ-фракции проводили с помощью MALDI. Для идентификации использовали белки карпа (табл.1) как вида с секвенированным геномом (BioProjects:PRJEB7241, NCBI; 5036 аминокислотных последовательностей в DB Proteins NCBI). Было отобрано семь белков НМ-фракции (рис.1). В таблице 1 представлено по одному кандидату с наибольшей величиной *score* для каждого белка.

В подфракции Alb мы идентифицировали четыре белка. Для белка с экспериментальной MW около 64 кДа гомологи были обнаружены в неаннотированной базе EST. Кандидатные последовательности с высокими величинами *score* были представлены библиотеками кДНК, сконструированными на основе популяций мРНК печени карпа (CF662379).

С помощью Protein BLAST найден гомолог 64 kDa-белка– “warm temperature acclimation-related 65 kDa protein”. Этот белок содержит в своей структуре “Hemorexin-like”-повторы, связывает гем и транспортирует его в печень (GenBank ACO51168.1) (Kinoshita et al., 2001). На рисунке 1 (b,c) он соответствует белку Hx. Для 53 kDa-белка кандидатом оказался фетуин Fet. Подобно альбумину, фетуин транспортирует в крови метаболиты. В своей структуре он содержит цистатин-подобный домен, характерный для семейства ингибиторов цистеиновых протеиназ Spi (Tsai et al., 2004). 20 kDa- и 14 kDa -белки идентифицированы как А-I и Apo-14 аполипопротеины соответственно (табл.1).

Таблица 1. Идентификация трансферрина и белков НМ-фракции плазмы карпа*

Обозначение Белка	Кандидатный белок (NCBI)	Accession Number (NCBI)	MW, kDa calc/obs	Score	Coverage %
Tf	transferrin variant C [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 189473159	73.134/63.8	159	38
Hx	Warm temperature acclimation-related 65 kDa protein [<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>]	GenBank ACO51168.1	- /63.4	173	43
Fet	Fetuin long form [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 29501368	51.666/52.8	144	6
ApoA-I	apolipoprotein A-I [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 13445027	20.797/22.0	260	63
Apo-14	14 kDa apolipoprotein [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 385865216	15.718/12.8	241	73
Hx	Warm-temperature-acclimation-related-65 kDa-protein [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 14388583	50.013/54.6	223	39
Spi	serine protease inhibitor [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 439153	45.846/48.5	129	11
Spi	Alpha-1-antitrypsin homolog; Flags: Precursor [<i>Cyprinus carpio</i>]	gi 416561	41.873/43.2	133	34

*кандидаты к белкам см на рис.1; обозначение белка см на рис.1

В подфракции Prealb мы идентифицировали три белка: белок “warm temperature acclimation-related 65 kDa”, проявляющий свойства гемопексина Hx, и два серпина - ингибитора сериновых протеиназ Spi (табл.1).

Обе подфракции карпа содержат один и тот же белок со свойствами гемопексина “warm-temperature-acclimation-related-65 kDa” с различными показателями MW — около 64 и 54 кДа соответственно, что свидетельствует о наличии в НМ-фракции различных его модификаций. Для разных кандидатов библиотеки кДНК охватывают разные области белка - N-концевую для белка подфракции Alb (GenBank ACO51168.1), и всю аминокислотную последовательность (1-439) для белка из подфракции Prealb (gi|14388583).

3. Организация НМ-фракции белков плазмы у морских рыб.

У морских видов структура НМ-фракции не была единой (рис.2). У одних видов фракция была организована по “пресноводному” типу, у других отличалась от него отсутствием в диск-Е массивного доминантного белка или в 2D-SDS-E аполипопротеина А-I в составе фракции.

Для НМ-фракций плазмы морских рыб использование Tf в качестве “навигатора” на протеомной карте плазмы было не всегда оправдано. В ряде случаев фракция располагалась правее от Tf, как и у пресноводных костистых, в других случаях типичные для НМ-фракции белки располагались вокруг (или ниже) Tf (рис.2).

Сравнительный анализ протеомных карт плазмы разных видов морских Teleostei выявил разнообразие их НМ-фракций как по положению на карте относительно Tf, так и по наличию/отсутствию на ней переносчиков липидов – аполипопротеинов. У камбалы, трески, бычков, звездочета оба аполипопротеина (А-I и Apo-14) присутствовали на карте; у султанки, зеленушки и морского налима отсутствовали (рис.2); у скорпены обнаружен один аполипопротеин А-I.

4. Идентификация белков НМ-фракции плазмы морских видов рыб.

Идентификацию белков проводили на примере речной камбалы, у которой на сегодняшний день секвенировано 596 нуклеотидных последовательностей (ДНК, РНК) (DB Genoms, NCBI) и 364 аминокислотных (DB Proteins, NCBI). В составе НМ-фракции её плазмы были идентифицированы те же белки, что и у карпа – белок со свойствами гемопексина (“warm- ...protein”), ингибиторы протеиназ серпина и аполипопротеины (табл.2).

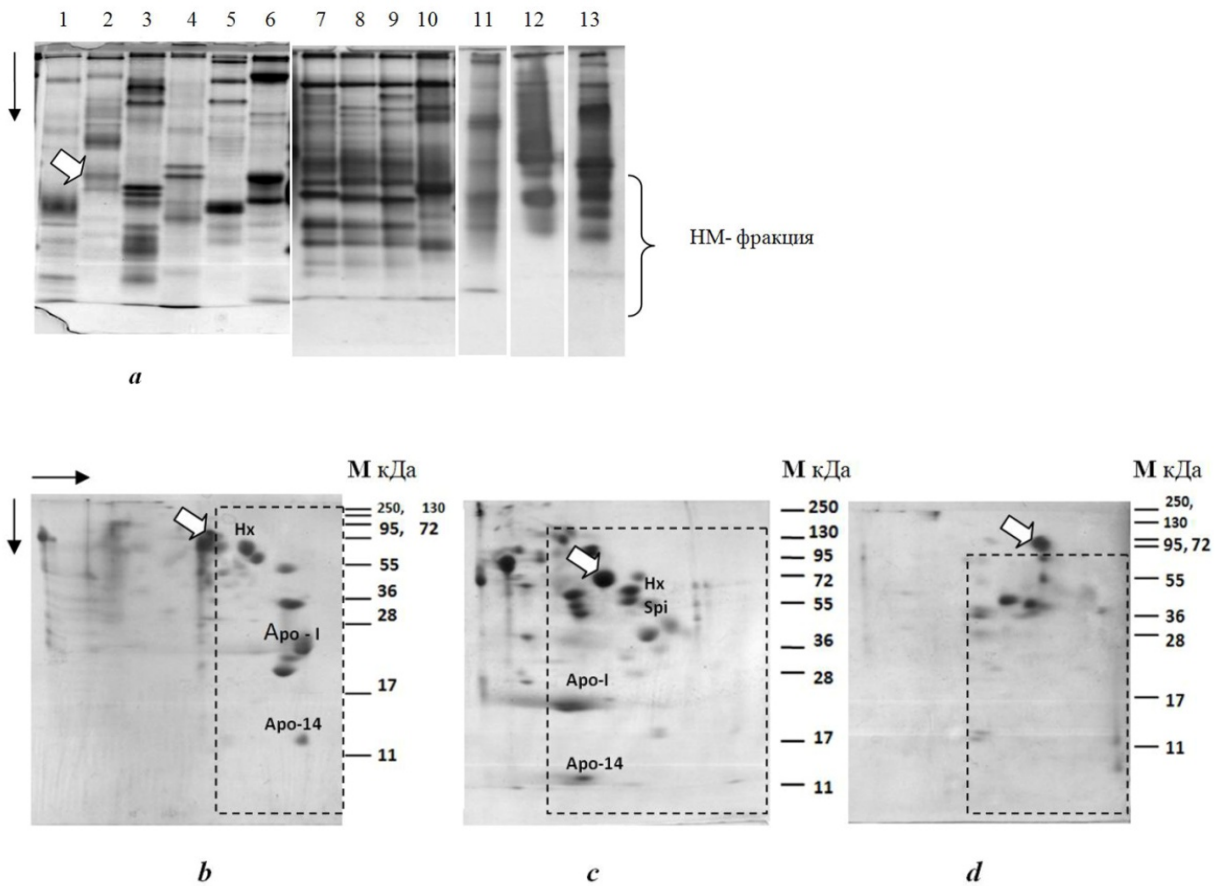


Рис.2. Диск-Е (а) и 2D-SDS-Е (b, с, d) плазмы морских видов рыб: а — султанки (1), морского налима (2), бычков мартовика (3) и кругляка (4), звездочета (5), скорпены (6), речной камбалы (7–10), лиманды (11), зубатки (12) и трески (13); b — бычка мартовика, с — речной камбалы, d — зеленушки. Обозначения — см рис.1.

Таблица 2. Идентификация белков НМ-фракции плазмы речной камбалы*

Обозначение белка	Кандидатный белок (NCBI)	Accession number (NCBI)	MW calc/obs, kDa	Score	Coverage %
Hx	warm temperature acclimation related-like 65kDa protein [<i>Harpagifer antarcticus</i>]	gi 169807830	48.372/64.2	116	20
Hx	warm-temperature-acclimation-related-65kDa- protein-like- protein precursor [<i>Takifugu rubripes</i>]	gi 74095891	49.438/64.2	79	2
Spi	alpha-1-antitrypsin [<i>Epinephelus coioides</i>]	ACJ05607.1	—/56.3	265	62
Apo A-I	apolipoprotein AI precursor [<i>Platichthys flesus</i>]	gi 60417202	29.374/23.6	217	53
Apo-14	14 kDa apolipoprotein [<i>Platichthys flesus</i>]	gi 60417188	15.763/12.1	106	56

*кандидаты к белкам см. на рис.2; обозначение белка см. на рис.2

5. Поиск белковых комплексов в составе НМ-фракций плазмы у пресноводных рыб.

Сравнительный анализ протеомных карт плазмы рыб в 2D-Е выявил сложную структуру доминирующего белка (Alb). У плотвы доминирующий белок и в ПААГ с 8М мочевиной и в SDS-ПААГ (восстанавливающие условия) диссоциировал на шесть – семь субъединиц. Произведен расчет величин MW белков на дорожке доминирующего белка: в градиенте ПААГ около 120 кДа; в ПААГ с мочевиной — около 30 (2), 65, 80–90 (3) и 200 кДа; в SDS-ПААГ — около 10, 14, 26, 40, 63 и 65 кДа (рис.3). Полученные результаты свидетельствуют о наличии в НМ-фракции плазмы плотвы белкового комплекса, стабилизированного нековалентными (в т.ч. водородными) связями.

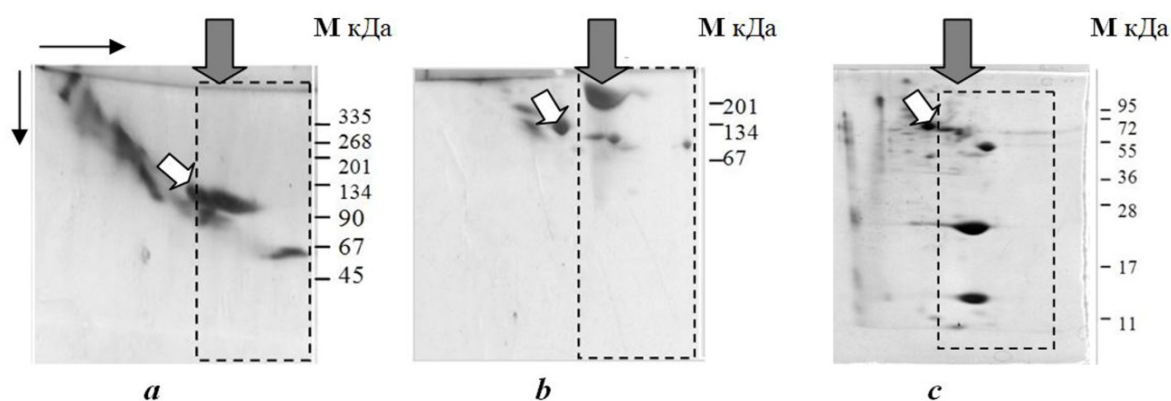


Рис.3. 2D-E белков плазмы плотвы в градиенте концентраций 5–40% ПААГ (а), в ПААГ с 8М мочевиной (б) и SDS-ПААГ (восстанавливающие условия) (с). Серая стрелка указывает на дорожку доминирующего белка. Пояснения в тексте.

Сходные результаты получены и для других видов пресноводных рыб. Сравнив их с протеомом НМ-фракции плазмы карпа, можно сделать вывод о наличии в составе белковых комплексов разных видов пресноводных костистых рыб одних и тех же белков — гемопексина (Нх) и аполипопротеинов А-I и Аро-14. В белковом комплексе плазмы плотвы они представлены олигомерными формами: мономерами (А-I, Нх), димерами (Нх), тетрамерами (А-I), октамерами (А-I) и олигомерами более высокого порядка (аро-14). Анализ масс-спектров нативных комплексов и денатурированных белков (субъединиц) показал присутствие в первых — сигналов от Нх, Аро А-I и Аро-14 (Андреева и др., 2015а).

б. Выявление белковых комплексов в составе НМ-фракций плазмы у морских рыб.

“Морской” тип НМ-фракций плазмы отличается от “пресноводного” отсутствием единообразия. У видов, имеющих в протеоме плазмы аполипопротеины (речная камбала, треска, бычки), обнаружены и белковые комплексы. У султанки, зеленушки и морского налима аполипопротеины отсутствовали; не обнаружены у них и белковые комплексы (рис.4).

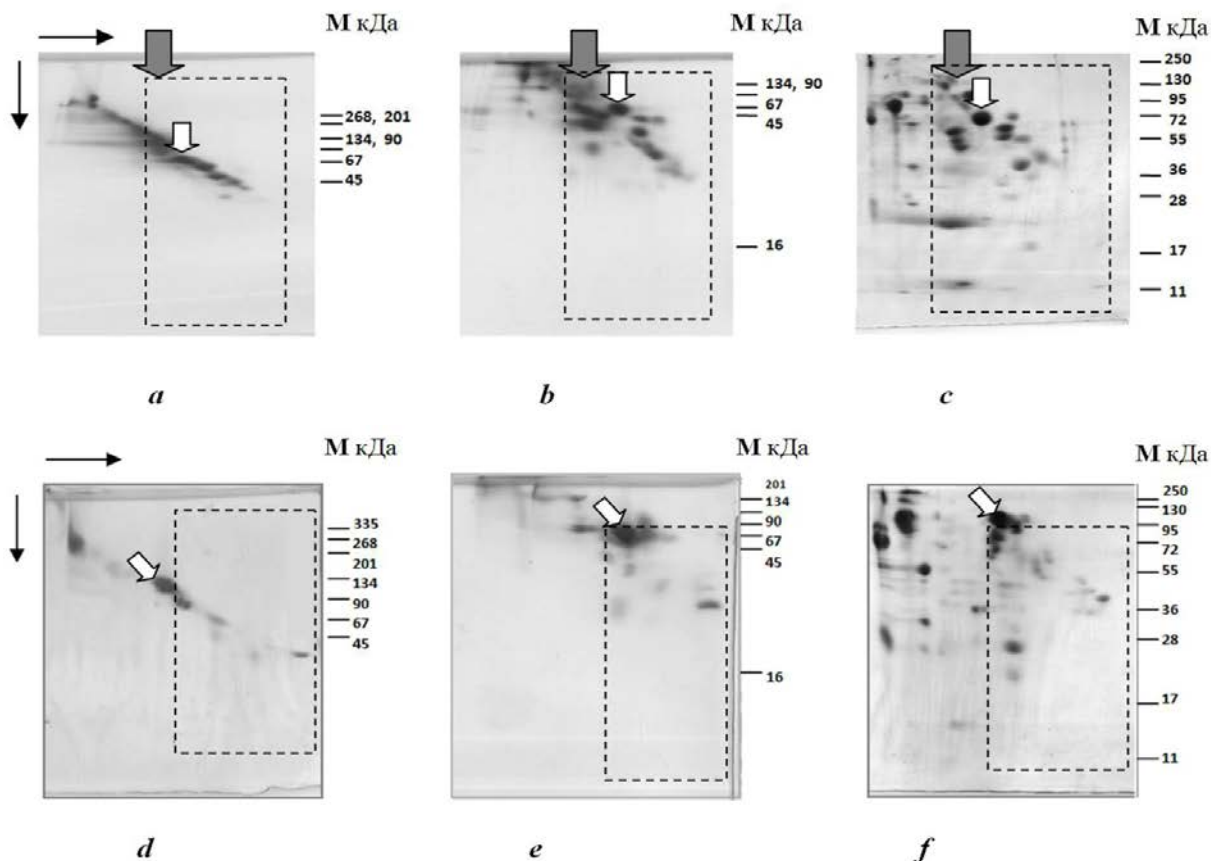


Рис.4. 2D-E белков плазмы речной камбалы (а, б, с) и скорпены (d, е, f) в градиенте концентраций 5–40% ПААГ (а,d), в ПААГ с 8М мочевиной (б, е) и SDS-ПААГ (восстанавливающие условия) (с, f). НМ-фракция белков плазмы выделена пунктиром. Белая стрелка указывает на трансферрин. Пояснения в тексте.

У речной камбалы белки НМ-фракции располагаются на протеомной карте по обе стороны от трансферрина. Слева от Tf на протеомной карте расположено четыре неденатурированных белка; им соответствует 10 денатурированных белков в ПААГ с мочевиной и SDS-ПААГ (рис.4а, b, c). В градиенте ПААГ, в области справа от Tf, расположены шесть неденатурированных белков. Им соответствует около 10-ти денатурированных белков в ПААГ с мочевиной и SDS-ПААГ. Сравнительный анализ MW и количества неденатурированных и денатурированных белков на 2D-Е плазмы камбалы позволяет предположить присутствие в ней белковых комплексов с MW от 90 до 120 кДа из мономеров Аро А-I, димеров Аро А-I и Аро-14, тетрамеров Аро А-I, а также более высокоорганизованных вариантов Аро-14.

У зеленушки, на протеомной карте плазмы которой не обнаружено аполипопротеинов, сопоставление количества белковых пятен (16 — в градиенте ПААГ; 17 — в ПААГ с мочевиной и 24 — в SDS-ПААГ) и величин MW в области НМ-фракции, не позволило предположить присутствие белковых комплексов. Такой же вывод сделан нами в отношении султанки, морского налима и скорпены (рис.4).

Таким образом, если у пресноводных видов структура протеома НМ-фракции плазмы и белковых комплексов в её составе отличается единообразием, то у морских видов можно выделить два типа протеома НМ-фракции – один сходен с “пресноводным” (по структуре и наличию комплексов), а второй отличается отсутствием комплексов.

7. Структурные реорганизации белковых комплексов плазмы в ходе сезонной динамики пресноводных рыб.

По структуре НМ-фракция была представлена двумя дискретными формами, которые мы назвали “базовой” и “пластической” (рис.5).

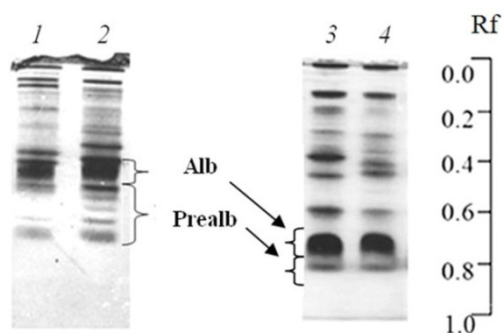


Рис.5 . “Базовый” (1,2) и “пластический” (3,4) типы НМ-фракции плазмы у леща.

Для НМ-фракции базового типа характерны: 1) минимальные показатели электрофоретической подвижности R_f доминирующего белка Alb, 2) максимальная гетерогенность подфракции Prealb и минимальные показатели R_f для её наиболее подвижного белка. Для НМ-фракции пластического типа характерны: 1) максимальные показатели R_f доминирующего белка Alb, 2) минимальная гетерогенность подфракции Prealb и максимальные показатели R_f для её наиболее подвижного белка

(рис.5).

MW неденатурированного доминирующего белка базового типа (около 120 кДа) всегда была выше, чем у белка пластического типа (около 100 кДа).

У половозрелых рыб базовый тип НМ-фракции был характерен для летне – осеннего (нагул) и зимнего периодов, а пластический – для весеннего (преднерестового и нерестового) периода. Весной при смене базового типа НМ-фракции плазмы на пластический, MW неденатурированного белкового комплекса плазмы снижалась со 120 до 100 кДа. При этом субъединичный состав комплекса оставался постоянным. Вероятно, в этот период доминирующий белок плазмы, организованный по типу белкового комплекса, претерпевал реорганизацию. При этом 120 кДа – комплексы из димеров “warm temperature...” белка (Hx) и олигомеров аполипопротеинов с липидами преобразовывался в комплекс из трех мономеров — “warm temperature ...” – белка (Hx) и двух аполипопротеинов.

8. Адаптации лещей к условиям повышенной солености в экспериментальных условиях.

При содержании лещей в соленой воде 8 и 10‰ нами не было обнаружено достоверных изменений относительного содержания (ОС) отдельных белков НМ-фракции плазмы по сравнению с контрольной группой. Выраженные изменения появились при помещении рыб в условия сублетальной солености — 11.5‰. Они сопровождались накоплением в мышечной жидкости 30 кДа- и 16 кДа - белков, являющихся мономерными формами аполипопротеинов Аро А-I и Аро-14 соответственно (рис.6).

Мономерные формы Аро присутствовали в мышечной жидкости лещей и в контрольной группе рыб (пресная вода) (рис.6). Но только при содержании рыб в соленой воде количество мономеров Аро в мышечной жидкости достигало максимальных по сравнению с контролем величин (рис.7).

Анализ содержания белков с разной MW в жидкостях организма рыб в условиях нарастающей солености показал, что в плазме относительное содержание 30–70 кДа- белков оставалось стабильным на всем соленостном диапазоне, между тем, как в мышечной жидкости тенденции снижения относи-

тельного содержания для 60–70 кДа-белков и нарастания содержания для 30 кДа-белка сопровождались снижением содержания белкового комплекса (рис.7).

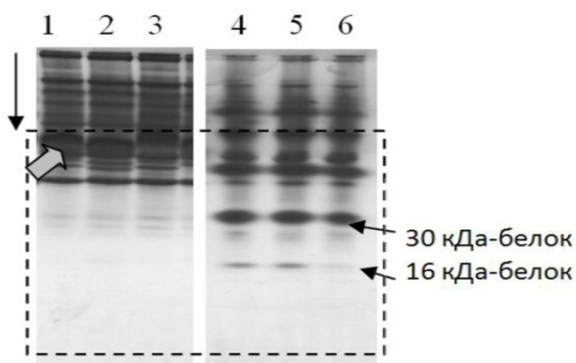


Рис.6. Электрофорез в градиенте концентраций ПААГ белков плазмы (1–3) и мышечной жидкости (4–6) леща. Серой стрелкой выделен белковый комплекс. Пояснения в тексте.

При 11.5‰ ОС белковых комплексов в плазме лещей снижалось почти в два раза, в мышечной жидкости в 3–4 раза; при этом, ОС Аро А-I в мышечной жидкости увеличивалось в 2 раза по сравнению со средними в группе рыб показателями (рис.7). Данное обстоятельство позволяет предположить, что при повышенной солёности пул мономерных аполипопротеинов в мышечной жидкости пополняется за счет диссоциации белкового комплекса из олигомерных форм аполипопротеинов.

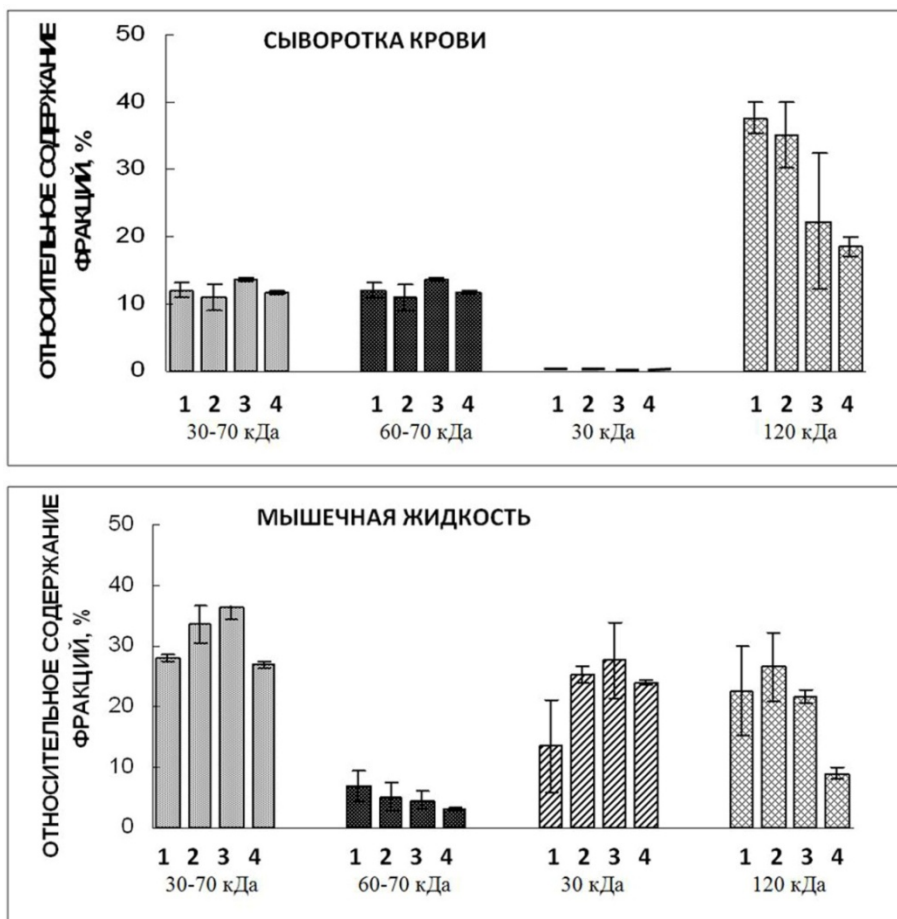


Рис.7. Динамика относительного содержания (%) белков НМ-фракции с различной молекулярной массой — 30–70 кДа, 30 кДа (Аро А-I), и 120 кДа (белковый комплекс), в сыворотке крови (а) и мышечной жидкости (б) лещей 2+. 1 — пресная вода, 2 — 8‰, 3 — 10‰, 4 — 11.5‰.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненной работы однозначно указывают на присутствие белковых комплексов в составе НМ-фракции плазмы у пресноводных костистых рыб, между тем, как в крови морских Teleostei комплексы обнаружены не у всех исследованных видов. У пресноводных рыб выявлена единая структура как НМ-фракций, так и белковых комплексов в их составе. С помощью MALDI в составе

фракции идентифицированы гемопексины, аполипопротеины и ингибиторы протеиназ серпины. У исследованных видов (карповых, окуневых и щуковых) обнаружены единые по составу белковые комплексы из трех транспортных белков – гемопексина (переносит гем) и негомологичных аполипопротеинов А-I и Apo-14 (переносчики липидов). Структурная организация этих комплексов меняется в течение года с 120 кДа-формы (базовый тип) на 100 кДа-форму (пластический тип). При этом, 120 кДа – комплексы, состоящие из олигомеров гемопексина и аполипопротеинов и липидов, преобразуются в 100 кДа-комплексы из мономерных форм тех же белков.

Годовая динамика белковых комплексов, вероятно, отражает особенности метаболизма рыб, а именно, доминирующую роль липидов в их энергетическом обмене (Durliat et al., 2000; Shen et al., 2000; Jiong Chen et al., 2009), в отличие от млекопитающих, в энергетике которых доминируют углеводы. Обнаружение мономерных форм гемопексина и аполипопротеинов в плазме (Andreeva et al., 2015a) и мышечной жидкости рыб, может отражать процесс транспорта липидов к различным тканям. Ведь у рыб, в отличие от млекопитающих, аполипопротеины (А-I) участвуют не только в обратном транспорте холестерина от тканей к печени, но и в его прямом транспорте от печени к тканям (Ando, Mori, 1993), взяв на себя функции переносчика липидов альбумина (у млекопитающих) (De Smet et al., 1998).

Между тем, у обитающих в море рыб единства в организации НМ-фракций плазмы не обнаружено. Различия между видами касаются и места локализации фракции на протеомной карте относительно трансферрина, и структуры фракции. У некоторых видов (треска, звездочет и бычки) НМ-фракция плазмы была организована по «пресноводному» типу, включающему и положение на протеомной карте относительно белка-«навигатора» трансферрина, и наличие всех характерных для фракции белков. У других видов (зеленушка, скорпена, речная камбала), положение фракции на карте относительно трансферрина было смещено. У султанки, морского налима и зеленушки – в протеоме НМ-фракции отсутствовали аполипопротеины. Тем не менее, у ряда видов (трески, речной камбалы, лиманды, всех видов бычков) белковые комплексы были обнаружены. Только в отличие от пресноводных, комплексы этих морских видов состояли, в основном, из аполипопротеинов.

Мы предполагаем, что особенности организации протеома плазмы рыб, в том числе и присутствия в нем белковых комплексов, обусловлены особенностями становления внутренней жидкой среды организма в эволюции рыб. Историческое прошлое костистых рыб традиционно связывают с длительной фазой жизни в море и дальнейшим освоением пресных вод (Ромер, Парсонс, 1992). Принимая во внимание формирование первичных белковых систем при солености внутренней среды организма около 8‰ (Хлебович, 1974), мы предположили, что белки древних морских рыб (предковых форм) могли существовать во внутренней жидкой среде как в виде отдельных полипептидов, так и в виде слабых белковых ассоциатов. Белки в ходе освоения рыбами пресных вод объединялись в выработанные комплексы для снижения величины онкотического давления крови, что стабилизировало процессы фильтрации в организме рыб. При освоении высокосолённых акваторий, вероятно, имела место противоположная тенденция – белковые ассоциаты “разваливались” на отдельные белки. В условиях гипертоничной внешней среды образование олигомеров из мономерных белков могло привести к снижению онкотического и общего осмотического давления крови рыб, и, как следствие, к усугублению угрозы их дегидратации. Поэтому морским видам, вероятно, “выгоднее” иметь в крови (наряду с небольшими транспортными комплексами) больше небольших белков-мономеров для противостояния обезвоживанию организма.

Учитывая доминирующую роль низкомолекулярных белков плазмы в осморегуляции (в её части, касающейся фильтрации) по сравнению с высокомолекулярными белками, можно предположить, что динамичное равновесие между олигомерной и мономерной формами белков в плазме и тканевой жидкости стабилизирует капиллярную фильтрацию внеклеточной жидкости в организме. Проведенные нами эксперименты по акклимации лещей к условиям нарастающей солености выявили смещение этого равновесия в сторону мономерных форм белков и их накоплению в мышечной жидкости организма. В связи с этим различия в структуре протеомных карт плазмы у пресноводных и морских видов можно объяснить модулирующей ролью солености среды обитания и разным типом ионной регуляции у рыб. Только вектор этого механизма имеет разные направления у диких видов рыб и в эксперименте: если у лещей накопление аполипопротеина А-I в мышечной жидкости происходит под действием нарастающей солености, то у морских костистых Apo А-I присутствует в крови далеко не у всех видов и, судя по имеющимся литературным данным, в некоторых тканях морских рыб не экспрессируется вовсе (Jiong Chen et al., 2009).

Данный пример демонстрирует действие “принципа экономии” в эксплуатации механизмов адаптации (Nochachka, Somero, 1973) и наводит на мысль об универсальном использовании механиз-

ма диссоциации белковых комплексов плазмы из транспортных белков для стабилизации обменных процессов в организме, включая энергетический и водный обмены.

Полученные в ходе исследования результаты об организации белковых комплексов и их пост-геномных преобразованиях в годовом цикле рыб и в экспериментальных условиях повышенной солености, позволяют рассматривать комплексы плазмы в качестве универсальных регуляторов обменных процессов в организме рыб.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала сотрудникам Института биологии южных морей (г.Севастополь) Рудневой И.И., Шайда В.Г. и сотрудникам отдела ихтиологии; сотруднику Института физико-химической биологии (МГУ) Серебряковой М.В. за анализ масс-спектров белков.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 13-04-00427-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.М. Структура сывороточного альбумина у рыб // Ж. эвол. биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 2. С. 111–118. [Andreeva A.M. The structure of fish serum albumins // J. Evol. Biochem. Physiol. 2010. Vol. 46. No 2. P. 135–144. DOI: 10.1134/S0022093010020018] In Russian.
- Андреева А.М., Ламаш Н.Е., Серебрякова М.В., Рябцева И.П., Большаков В.В. Реорганизация низкомолекулярной фракции белков плазмы в годовом цикле карповых рыб // Биохимия. 2015а. Т.80. Вып.2. С. 256–268. [Andreeva A.M., Lamas N.E., Serebryakova M.V., Ryabtseva I.P., Bolshakov V.V. Reorganization of low-molecular-weight fraction of plasma proteins in the annual cycle of Cyprinidae // Biochemistry (Moscow). 2015. №2. P.208–218. January 25, 2015, MS BM14–236 (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) (online form). DOI: 10.1134/S0006297915020078.] In Russian.
- Андреева А.М., Серебрякова М.В., Ламаш Н.Е., Федоров Р.А., Рябцева И.П. Особенности организации белков низкомолекулярной фракции плазмы у дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* и других CYPRINIDAE // Биология моря. 2015b. Т. 41. № 1. С. 55–63. [Andreeva A.M., Serebryakova M.V., Lamash N.E., Fedorov R.A., Ryabtseva I.P. Structural features of the low-molecular-weight plasma fraction in far eastern redfins of the genus *Tribolodon* and other Cyprinid fishes // Russian J. Marine Biology. 2015. Vol. 41. No 1. P. 60–68. DOI: 10.1134/S1063074015010022] In Russian.
- Андреева А.М., Федоров Р.А. Особенности организации низкомолекулярных белков крови и каневой жидкости у ската-хвостокола *Dasyatis pastinaca* (Chondroichthyes: Trygonidae) // Биология моря. 2010. Т. 36. № 6. С. 460–462. [Andreeva, AM; Fedorov, RA. Features of the organization of low-molecular weight proteins from the blood and tissue fluid of the common stingray *Dasyatis pastinaca* L. (Chondroichthyes: Trigonidae) // Russian J. Marine Biology. 2010. Vol. 36. No 6. P. 469–472. <http://shark-references.com/index.php?lang=en>). SpringerLink.
- Мартемьянов В.И. Влияние солености на пресноводных рыб // Зоол. ж. 1989. Т. 68. № 5. С. 72–81. Martem'yanov V.I. Vliyanie solenosti na presnovodnykh ryb // Zool. zhurnal. 1989. T.68. № 5. S. 72–81. [Martemyanov V.I. Effect of salinity on freshwater fish // Russian J. Zoology. 1989. Vol. 68. No 5. P. 72–81.] In Russian.
- Ромер А., Парсонс Т. Анатомия позвоночных. В 2-х томах. М.: Мир, 1992. 764 с. [Romer A.S., Parsons Th.S. The Vertebrate Body. Philadelphia – NY – Chicago: Saunders College Publishing, 1986. 624p.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. Определение стадий зрелости и изучение половых продуктов рыб. Мурманск: ПИНРО. 1968. 46с. Sakun O.F., Butskaya N.A. Opredelenie stadiy zrelosti I izuchenie polovykx produktov ryb. Murmansk. PINRO. 1968. 46s. [Sakun O.F., Butskaya N.A. Determination of stages of maturity and the study of sexual products of fish. Murmansk. PINRO. 1968. 46 p.] In Russian.
- Хлебович В.В. 1974. Критическая соленость биологических процессов. Л.: Наука, 236с. Khlebovich V.V. Kriticheskaya solenost' biologicheskikh potsessov. Leningrad: Nauka, 1974. 236 s [Khlebovich V.V. The critical salinity of biological processes. 1974. Leningrad: Science, 1974, 236p.] In Russian.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398с. [Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation. Philladelphia–London–Toronto: W.B. Saunders Company, 1973, 358 p In English.] In Russian.
- Шульц Г., Ширмер Р. 1982. Принципы структурной организации белков. М.:Мир. 354 с. [Schulz, G.E., Schirmer, R.H. Principles of Protein Structure. Springer, 1979, 314 p. In English.] In Russian.
- Ali Han, M.V., Rashid, Z., Ali Han, V., Ali, R. Biochemical, biophysical and thermodynamic analysis of human serum albumin glycated in vivo // Biochemistry (Moscow). 2007. Т. 72(2). С. 175–183.
- Anderson, N.L., Polanski, M., Pieper, R., Gatlin, T., Tirumalai, R.S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Adkins, J.N., Pounds, J.G., Fagan, R., and Lobley, A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources // Mol. Cell Proteomics. 2004. Vol. 3. P. 311–326.
- Ando, S., Mori, Y. Characteristics of serum lipoprotein features associated with lipid levels of muscle and liver from five species of fish // Nippon Suisan Gakkaishi. 1993. Vol. 59. P. 1565–1571.
- Andreeva A.M. Structural and functional organization of fish blood proteins. NY: Nova Science Publisher, 2012. 188 p.

- Babaei F., Ramalingam R., Tavendale A. et al. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish // *J. Proteome Res.* 2013. Vol. 12. No. 4. P. 1580–1590.
- Braceland M., Bickerdike R., Tinsley J. et al. The serum proteome of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during pancreas disease (PD) following infection with salmonid alphavirus subtype 3 (SAV3) // *J. Proteomics.* 2013. Vol. 94. P. 423–436.
- Creighton T.E. Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 129. P. 235–264.
- De Smet, H., Blust, R., Moens, L. Absence of albumin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*: binding of fatty acids to high density lipoprotein // *Fish Physiol. Biochem.* 1998. Vol. 19. P. 71–81.
- Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Nynca, J. et al., Characterization of carp seminal plasma proteome in relation to blood plasma // *J. Proteomics.* 2014. Vol. 98. P. 218–232.
- Durliat, M., Andrea, M., Babin, P.J. Conserved protein motifs and structural organization of a fish gene homologous to mammalian apolipoprotein E // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 549–559.
- Jiong Chen, Yu H. Shi, Hai Q. Hu, He Niu, Ming, Y. Li. Apolipoprotein A-I, a hyperosmotic adaptation-related protein in ayu (*Plecoglossus altivelis*) // *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 2009. Vol. 152. P. 196–201.
- Kinoshita, S., Itoi, S., and Watabe, S. cDNA cloning and characterization of the warm-temperature-acclimation-associated protein Wap65 from carp, *Cyprinus carpio* // *Fish Physiol. Biochem.* 2001. Vol. 24. P. 125–134.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* 1970. Vol. 227(4). No. 5259. P. 680–685.
- Lazarev V.F., Sverchinskyi D.V., Ippolitova M.V., Stepanova A.V., Guzhova I.V., Margulis B.A. Factors affecting aggregate formation in cell models of huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. No. 2. P. 81–89.
- Low C.F., Shamsudin M.N., Chee H.Y. et al. Putative apolipoprotein A-I, natural killer cell enhancement factor and lysozyme g are involved in the early immune response of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* Forskal, to *Vibrio alginolyticus* // *J. Fish Dis.* 2014. Vol. 37. No. 8. P. 693–701.
- Lucitt M.B., Price T.S., Pizarro A. et al. Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development // *Mol. Cell. Proteomics* // 2008. Vol. 7. No. 5. P. 981–994.
- Margulis, B., Kinev, A., Guzhova, I. Heat Shock Proteins in Biology and Medicine. Kerala, India: Research Signpost, 2006. P. 305–329.
- Shen, Y., Lindberg, A., Olivecrona, G. Apolipoprotein CII from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is functionally active but structurally very different from mammalian apolipoprotein CII // *Gene.* 2000. Vol. 254. P. 189–198.
- Tsai P.L., Chen C.H., Huang C.J. et al. Purification and cloning of an endogenous protein inhibitor of carp nephrosin, an astacin metalloproteinase // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. No. 12. P. 11146–11155.

ORGANIZATION OF PLASMA PROTEIN COMPLEXES IN BONY FISH

A. M. Andreeva, I. P. Ryabtseva, R. A. Fedorov

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Yaroslavl, Nekouz, Russia; e-mail: aam@ibiw.yaroslavl.ru*

The organization of the low-molecular (LM) plasma protein fraction and its protein complexes in fresh- (FW) and sea-water (SW) Teleostei were investigated. Hemopexin (Hx), nonhomologous apolipoproteins (A-I and Apo-14) and inhibitors of serine proteinases (Spi) were identified in this fraction using MALDI. Protein complexes in FW-fishes were organized uniformly – by oligomeric forms Hx and Apo. In spring the oligomeric complexes were reorganized in complex consist of monomeric Hx and Apo. Structural diversity of LM-fraction were observed in SW- fishes. Its plasma protein complexes differed in composition from ones by FW- fishes. In addition, some species had complexes, others had no ones. There are no apolipoprotein A-I in plasma zone SW-species. Participation of plasma protein complexes in stabilization of metabolic processes is discussed. It is assumed that plasma protein aggregation influence on features of internal organism fluid medium formation in Pisces evolution.

Keywords: teleosts, plasma, proteins, MALDI

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРЕСНОВОДНЫХ КОСТИСТЫХ РЫБ

Е. А. Заботкина¹, Т. Б. Лапирова¹, В. Е. Середняков², Т. А. Нестерова²

¹ Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru;

² ЯрГУ им. П. Г. Демидова
150000 г. Ярославль, пр. Матросова, 9, e-mail: serednyakov@mail.ru

Изучена зависимость гематологических показателей у рыб Рыбинского водохранилища от факторов среды, типа питания, подвижности и т.д. Показано, что чаще всего показатели красной (объем, индекс формы и соотношение ядро/цитоплазма и незрелые/зрелые эритроциты) и белой крови зависят от чувствительности рыб к насыщению среды кислородом.

Ключевые слова: гематологические показатели, эритроциты, лейкоциты, факторы среды, рыбы, Рыбинское водохранилище

ВВЕДЕНИЕ

Кровь относится к одной из наиболее пластичных к факторам среды систем организма. В первую очередь это обуславливается ее составом и функциями. Морфологический состав и соотношение эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови рыб — достаточно информативные показатели, которые отражают различные аспекты существования рыб: состояние здоровья, видовую специфику, сезонные изменения, особенности образа жизни, питания, местообитания, стадии жизненного цикла и т.д. (Антипова, 1954; Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 2004; Иванова, 1983; Яхненко, 1980; Яхненко, Клименков, 2009). К функциям крови в первую очередь следует отнести транспортную: перенос питательных веществ от органов пищеварения к другим тканям, метаболитов от места образования к местам обезвреживания и экскреции, транспорт кислорода и углекислоты между тканями и органами дыхания, перенос гормонов от желез внутренней секреции к тканям, транспорт факторов иммунитета.

В основном эта функция связана с эритроцитами. Они переносят адсорбированные на поверхности питательные вещества, биологически активные вещества, обмениваются липидами с плазмой крови, участвуют в регуляции кислотно-щелочного и ионного равновесия, водно-солевого обмена. За счет адсорбции на поверхности клеток различных веществ, эритроциты опосредованно принимают участие в явлениях иммунитета, а также в регуляции активности свертывающей системы крови. Но основной функцией эритроцитов, безусловно, является дыхательная функция, т.е. способность связывать и переносить кислород и углекислый газ, что обуславливается содержащимся в эритроцитах гемоглобином. Иммунная функция крови, связанная с синтезом и переносом факторов иммунитета, осуществлением фагоцитоза, выполняется клетками белой крови, или лейкоцитами, и гуморальными веществами сыворотки крови. Состав и соотношение лейкоцитов в периферической крови рыб, а также иммунокомпетентных органах — информативный показатель, свидетельствующий о состоянии здоровья рыб (Nazarova, Zabolkina, 2010). Тромбоциты вместе с гуморальными факторами напрямую отвечают за процессы свертывания крови (Житенева и др., 2004).

Отличительной чертой клеток крови рыб, как низших позвоночных, является наличие ядер в эритроцитах и тромбоцитах. Этот факт, а также наличие сосудистого кроветворения, определяют возможность митотического и amitotического деления клеток непосредственно в сосудах периферического русла (Житенева и др., 2004).

В пресных водоемах рыбы освоили все биотопы, и приспособились к различным условиям обитания, имеют достоверные отличия по составу эритроцитов и лейкоцитов от морских видов костистых рыб (Soldatov, 2005; Nazarova, Zabolkina, 2010). Известно, что показатели крови достаточно сильно отличаются как у разных видов рыб, обитающих в одном и том же водоеме, так и в пределах вида (Larigova, Zabolkina, 2010). Вместе с тем, не известно, какие факторы играют преимущественную роль в различиях показателей красной и белой крови у костистых рыб.

Цель работы — анализ состава и соотношения эритроцитов и лейкоцитов периферической крови 28 видов костистых рыб, обитающих в Рыбинском водохранилище и его притоках, в зависимости от экологических факторов и особенностей среды их обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Периферическую кровь отбирали у половозрелых особей, отловленных в августе–сентябре в Волжском и Моложском плесах Рыбинского водохранилища и в нижних участках р. Ильдь — притоке Рыбинского водохранилища. Отлов рыбы осуществляли неводом с экспедиционного судна «Бота-

ник» или тралом с экспедиционных судов «Ареал» и «Академик Топчиев» в 1998–2012 гг. В целом были исследованы показатели 28 видов рыб, населяющих Рыбинское водохранилище и относящихся к 8 отрядам: отр. Окунеобразные — речной окунь (*Perca fluviatilis* L.), обыкновенный судак (*Stizostedion lucioperca* L.), волжский судак, берш (*Stizostedion volgense* Gmelin, 1788), обыкновенный ерш (*Gymnocephalus cernuus* L.), тупоносый бычок (*Proterorhinus marmoratus* Smitt, 1900); отр. Карпообразные — обыкновенная верховка (*Leucaspis delineates* Heckel, 1843), лещ (*Abramis brama* L.), синец (*Ballerus ballerus* L.), густера (*Blicca bjoerkna* L.), карп (*Cyprinus carpio* L.), обыкновенный карась (*Carassius carassius* L.), уклея (*Alburnus alburnus* L.), жерех (*Aspius aspius* L.), пескарь (*Gobio gobio* L.), линь (*Tinca tinca* L.), язь (*Leuciscus idus* L.), белоглазка (*Abramis sapa* Pallas, 1814), голец усатый (*Barbatula barbatula* L.), обыкновенная щиповка (*Cobitis taenia* L.), чехонь (*Pelecus cultratus* L.); отр. Скорпенообразные — обыкновенный подкаменщик (*Gottus gobio* L.); отр. Трескообразные — налим (*Lota lota* L.); отр. Лососеобразные — снеток (*Osmerus eperlanus* L.), пелядь (*Coregonus peled* Gmelin, 1789), европейская ряпушка (*Coregonus albula* L.); отр. Сельдеобразные — тюлька (*Clupeonella cultriventris* Normann, 1840); отр. Щукообразные — обыкновенная щука (*Esox lucius* L.); отр. Сомообразные — сом европейский (*Silurus glanis* L.).

Анализ состава и соотношения лейкоцитов и эритроцитов проводили на мазках периферической крови, полученной методом каудозктомии, которые фиксировали этиловым спиртом и окрашивали краской Романовского-Гимза. Мазки анализировали с использованием светового микроскопа Keyence VHX 1000E с объективом Z500. При идентификации типов лейкоцитов пользовались классификацией Н.Т. Ивановой (1983): обнаруженные лейкоциты дифференцировали как гемоцитобласты, лимфоциты, моноциты, миелоциты, метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы. Для получения лейкограммы на каждом мазке подсчитывали не менее 200 клеток, результаты выражали в процентах. Эритроциты разделяли на бласты, незрелые эритроциты, зрелые эритроциты. Долю каждой группы эритроцитов определяли по формуле:

$$M = n/m \times 100\%,$$

где M — доля определенной формы эритроцитов; n — число эритроцитов конкретной формы; m — общее число исследованных эритроцитов (Житенева и др., 2004).

Расчет объемов клетки и ядра эритроцитов осуществляли по формуле:

$$V = l \times h \times 0,785,$$

где l — длина эритроцита / ядра, мкм; h — ширина эритроцита / ядра, мкм; V — объем эритроцита / ядра, мкм³;

Расчет ядерно-цитоплазменного отношения:

$$Я/ц \text{ отношение} = V_{я} / V_{к},$$

где $V_{я}$ — объем ядра, мкм³; $V_{к}$ — объем клетки, мкм³.

Расчет индекса формы:

$$I\phi = h / l,$$

где l — длина эритроцита / ядра, мкм; h — ширина эритроцита / ядра, мкм

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ Excel, Past. Оценку результатов проводили параметрическим методом для несвязанных выборок (t -критерий Стьюдента) при уровне достоверности ≤ 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что как эритроциты, так и лейкоциты, и тромбоциты в периферической крови рыб имеют широкие пределы варьирования (Табл. 1–3).

Эритроциты. Анализ цитометрических параметров эритроцитов показал, что наибольшим объемом обладают эритроциты карася обыкновенного, наименьшим — обыкновенной щуки и чехони. Большой объем клеток также оказался у пеляди, щиповки, ряпушки и верховки (> 700 мкм³) (Табл. 1). Наибольший объем ядер эритроцитов отмечен у обыкновенной ряпушки, наименьший — у жереха. Так как гемоглобин, ответственный за газообмен в организме содержится в основном в цитоплазме клеток, для оценки их функционального потенциала важнее ядерно-цитоплазменное отношение и индекс формы клеток (Табл. 1). Наименьшее ядерно-цитоплазменное отношение (т.е. объем цитоплазмы наибольший) отмечен у снетка, хотя объем клетки небольшой по сравнению с другими видами. Наибольшее ядерно-цитоплазменное отношение наблюдается у налима, при этом объем клетки сравним с объемом эритроцита у снетка, и индексы формы клеток имеют близкие значения.

Таблица 1. Морфометрические параметры эритроцитов пресноводных костистых рыб Рыбинского водохранилища

Вид рыбы	Размеры эритроцита, мкм		Объем эритроцита, мкм ³	Размеры ядра эритроцита, мкм		Объем ядра эритроцита, мкм ³	Я/ц отношение*	I _ф *
	Длина, <i>l</i>	Ширина, <i>h</i>		Длина, <i>l</i>	Ширина, <i>h</i>			
Сом обыкновенный	10.8±0.9	8.5±0.9	608.7±119.1	3.4±0.4	2.6±0.4	18.5±6.1	0.03	0.79±0.11
Налим	9.6±0.8	7.8±0.6	460.5±92.9	3.4±0.4	2.9±0.3	21.8±5.1	0.38	0.81±0.07
Снеток	10.2±1.2	7.6±0.7	469.4±81.3	3.8±0.4	2.9±0.4	25.0±7.6	0.01	0.73±0.08
Ряпушка европейская	14.1±0.8	8.3±0.7	774.8±92.5	6.8±0.5	3.9±0.4	80.7±19.9	0.10	0.60±0.06
Пелядь	15.3±0.8	9.3±0.6	1031.4±141.2	5.5±0.6	3.4±0.5	50.3±15.1	0.05	0.61±0.05
Окунь обыкновенный	9.9±0.6	7.9±0.7	491.4±104.8	3.0±0.4	2.7±0.3	17.3±4.8	0.04	0.79±0.07
Судак	9.6±0.9	7.6±0.7	438.9±73.7	4.4±0.3	2.9±0.4	30.8±0.9	0.07	0.81±0.15
Берш	11.3±0.9	8.1±0.5	589.1±74.4	4.4±0.4	3.3±0.3	37.4±6.7	0.06	0.73±0.08
Бычок	10.9±1.5	7.1±0.9	435.7±95.5	3.8±0.4	2.4±0.3	17.7±5.2	0.04	0.67±0.14
Щука обыкновенная	10.1±1.2	6.5±0.4	333.3±63.6	4.2±0.4	2.7±0.4	24.7±7.5	0.07	0.65±0.09
Белоглазка	10.9±0.9	8.4±1.3	614.3±174.9	4.3±0.5	3.0±0.5	31.7±10.6	0.052	0.78±0.17
Синец	11.2±0.9	8.3±0.7	616.9±109.4	3.7±0.4	2.6±0.5	20.6±8.4	0.03	0.75±0.08
Лещ	13.6±1.2	7.0±0.4	522.6±72.2	4.6±0.3	2.57±0.3	22.6±5.5	0.04	0.7±0.52
Уклейка	10.6±0.9	7.5±0.7	467.3±88.7	4.5±0.5	3.1±0.5	35.9±13.4	0.08	0.82±0.72
Жерех	12.1±0.9	8.5±0.6	687.5±120.8	3.7±0.4	2.3±0.3	16.1±4.2	0.02	0.71±0.06
Плотва	11.3±1.1	7.8±0.7	547.9±110.2	3.7±0.5	2.7±0.5	21.7±7.3	0.04	0.7±0.09
Язь	11.1±1.1	8.4±0.9	619.9±142.6	4.4±0.5	3.3±0.6	39.1±14.7	0.06	0.76±0.11
Верховка	12.6±2.5	8.6±1.6	772.9±384.3	4.8±0.6	3.4±0.5	45.4±13.8	0.06	0.69±0.14
Карась обыкновенный	19.3 ±1.1	11.6±0.9	2034.2±321.5	6.9±0.4	3.3±0.5	58.9±17.4	0.03	0.60±0.07
Линь	10.4±1.0	7.7±0.9	486.1±124.0	3.6±0.5	3.1±0.4	27.7±10.1	0.06	0.75±0.12
Карп	14.0±0.8	6.7±0.4	490.2±57.4	5.5±0.4	3.6±0.4	56.5±13.9	0.12	0.40±0.05
Голец усатый	10.6±1.4	7.4±0.9	454.7±120.6	3.6±0.7	2.6±0.7	20.5±10.8	0.05	0.71±0.15
Пескарь обыкновенный	11.9±1.3	8.4±0.8	662.3±115.4	4.8±0.4	3.2±0.3	38.1±6.6	0.06	0.72±0.11
Густера	12.1±1.2	8.4±0.9	677.8±156.3	4.6±0.3	3.2±0.5	37.7±11.8	0.06	0.7±0.12
Чехонь	10.3±1.2	7.0±1.2	396.9±112.9	4.0±0.5	2.5±0.5	23.2±8.9	0.06	0.69±0.17
Щиповка обыкновенная	12.8±1.7	8.5±1.0	712.8±135.8	5.5±0.5	3.6±0.5	55.9±17.7	0.08	0.67±0.14
Подкаменщик обыкновенный	10.9±1.2	8.1±0.7	560.5±110.6	3.6±0.5	2.9±0.4	24.0±7.5	0.04	0.75±0.11
Тюлька черноморско-каспийская	10.6±1.1	7.2±0.8	432.6±92.1	4.5±0.5	2.8±0.4	29.1±9.9	0.07	0.69±0.12

Примечание: Здесь и далее: Я / ц отношение — ядерно-цитоплазматическое отношение; I_ф — индекс формы; M ± m — среднее ± ошибка среднего

Анализ сходства параметров показывает, что можно выделить несколько групп:

— по объему клеток: 1-я группа — чехонь, щука; 2-я — укляя, снеток, голец, налим, линь, карп, окунь, тюлька, бычок, судак; 3-я — язь, белоглазка, синец, сом, берш, лещ, подкаменщик, плотва; 4-я — жерех, густера, пескарь, щиповка; 5-я — верховка, ряпушка; 6-я — пелядь; 7-я — карась (Рис. 1);

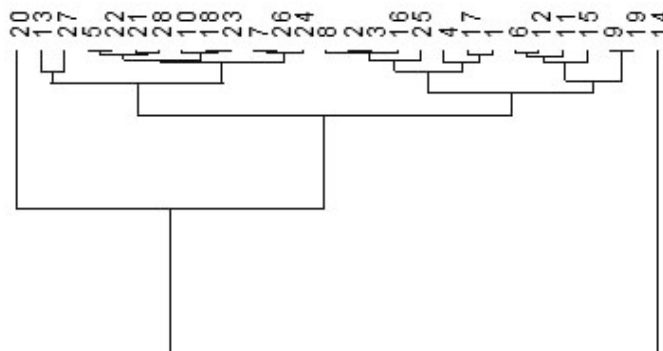


Рис. 1. Дендрограмма сходства видов рыб по объему эритроцитов.

1 — плотва, 2 — белоглазка, 3 — синец, 4 — лещ, 5 — уклейка, 6 — жерех, 7 — тюлька, 8 — язь, 9 — верховка, 10 — линь, 11 — пескарь, 12 — густера, 13 — чехонь, 14 — карась, 15 — щиповка, 16 — сом, 17 — подкаменщик, 18 — карп, 19 — ряпушка, 20 — пелядь, 21 — голец, 22 — снеток, 23 — окунь, 24 — судак, 25 — берш, 26 — бычок, 27 — щука, 28 — налим.

— по ядерно-цитоплазменному отношению: 1-я группа — снеток, жерех; 2-я — пелядь, белоглазка, голец, окунь, бычок, лещ, плотва, подкаменщик, синец, сом, карась; 3-я — берш, язь, верховка, линь, пескарь, густера, чехонь, укляя, щиповка, судак, щука, тюлька; 4-я — карп, ряпушка; 5-я — налим (Рис. 2);



Рис. 2. Дендрограмма сходства рыб по ядерно-цитоплазменному отношению эритроцитов

1 — сом, 2 — налим, 3 — снеток, 4 — ряпушка, 5 — пелядь, 6 — окунь, 7 — судак, 8 — берш, 9 — бычок, 10 — щука, 11 — белоглазка, 12 — синец, 13 — лещ, 14 — уклейка, 15 — жерех, 16 — плотва, 17 — язь, 18 — верховка, 19 — карась, 20 — линь, 21 — карп, 22 — голец, 23 — пескарь, 24 — густера, 25 — чехонь, 26 — щиповка, 27 — подкаменщик, 28 — тюлька.

— по индексу формы: 1-я группа — карп; 2-я — карась, ряпушка, пелядь, лещ; 3-я — тюлька, верховка, чехонь, густера, плотва, снеток, берш, уклейка, пескарь, жерех, голец, щиповка, бычок, щука; 5-я — язь, синец, линь, подкаменщик, сом, окунь, белоглазка, судак, налим (Рис. 3).

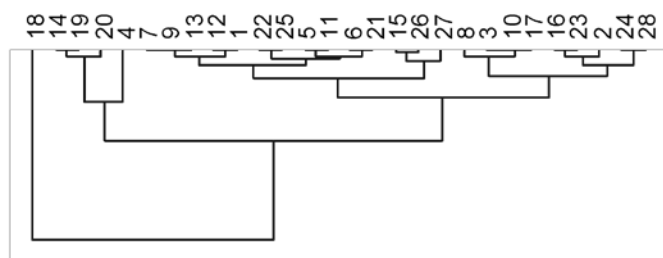


Рис. 3. Дендрограмма сходства эритроцитов костистых рыб по индексу формы.

1 — плотва, 2 — белоглазка, 3 — синец, 4 — лещ, 5 — уклейка, 6 — жерех, 7 — тюлька, 8 — язь, 9 — верховка, 10 — линь, 11 — пескарь, 12 — густера, 13 — чехонь, 14 — карась, 15 — щиповка, 16 — сом, 17 — подкаменщик, 18 — карп, 19 — ряпушка, 20 — пелядь, 21 — голец, 22 — снеток, 23 — окунь, 24 — судак, 25 — берш, 26 — бычок, 27 — щука, 28 — налим.

При анализе полученных данных учитывали следующие факторы: требовательность к насыщению воды кислородом, местообитание, подвижность, тип питания.

Согласно Никольскому Г.В. (1963) всех рыб по потребности к насыщенности воды кислородом можно разделить на 4 группы:

- требующие очень большого насыщения воды кислородом (7–11 мг/л) (усатый голец, обыкновенный подкаменщик, европейская ряпушка, снеток);
- требующие большого насыщения воды кислородом (5–7 мг/л) (пескарь, налим, жерех, чехонь, уклея обыкновенная, судак, берш, густера, тюлька, верховка, язь обыкновенный);
- требующие сравнительно небольшого количества кислорода (до 4 мг/л) (Плотва, окунь, пелядь, сом обыкновенный, щука обыкновенная, карп, лещ, белоглазка, синец);
- выдерживающие очень слабое насыщение воды кислородом (до 0,5 мг/л) (лινь, карась, щиповка обыкновенная, бычок).

По местообитанию исследованные виды рыб можно разделить на обитателей литорали (снеток, уклея обыкновенная, верховка, чехонь), пелагиали (ряпушка обыкновенная, пелядь, снеток, щука обыкновенная, синец, лещ, усатый голец, белоглазка, жерех, густера, карась, карп, язь обыкновенный, плотва, окунь обыкновенный, судак, бычок, тюлька).

По типу питания — на эврифагов (плотва, язь обыкновенный), планктофагов (синец, уклея обыкновенная, ряпушка обыкновенная, пелядь, тюлька, верховка, снеток), детритофагов (бентофагов) (белоглазка, лещ, лινь, пескарь обыкновенный, густера, голец усатый, карась, щиповка обыкновенная, подкаменщик обыкновенный, карп, бычок), хищников (жерех, чехонь, карась, сом обыкновенный, налим, окунь обыкновенный, судак, берш, щука обыкновенная).

Крупные размеры эритроцитов карася могут быть связаны с особенностями обитания. Карась относится к группе рыб, способных обитать в условиях крайне низкого содержания кислорода в воде, и крупные эритроциты обеспечивают содержание в них большого количества гемоглобина и способствуют более успешному извлечению кислорода из среды. Также крупные эритроциты обнаружены у ряпушки и пеляди, которые, наоборот, предпочитают среду с высоким содержанием кислорода. Согласно литературным данным, у сем. Сиговых количество эритроцитов в периферической крови ниже, чем у представителей других отрядов (Головина, 2007; Иванова, 1983).

Установлено, что у подавляющего количества видов рыб, способных обитать в среде, бедной кислородом (умеренная степень гипоксии), наблюдаются более низкие показатели объема клетки. В условиях экстремальной гипоксии наблюдается обратная реакция — рыбы, в большинстве случаев, имеют больший объем эритроцита (Андреева, 2014).

Из 28 исследованных видов рыб 7 относятся к малоподвижным обитателям бентали (Атлас..., 2003). В данной группе отмечена наибольшая однородность размеров эритроцитов. У всех исследованных видов эритроциты являются некрупными, но не самыми маленькими. Относительно небольшие размеры эритроцитов, в данном случае, могут быть обусловлены тем, что малоподвижные виды затрачивают относительно немного энергии на передвижение, следовательно, им требуется меньше кислорода. У обитателей бентали, ведущих хищный образ жизни, отмечена высокая численность эритроцитов в кровеносном русле (Анисимова, Лавровский, 1983). Тип питания и место обитания рыб не оказывают влияния на объем клеток красной крови.

Размеры эритроцитов синца из Рыбинского водохранилища подобны таковым, приведенным в работе Н.Т. Ивановой (Иванова, 1983). Наибольший объем ядер эритроцитов отмечали у обыкновенной ряпушки, наименьший — у жереха (Табл.1.).

Крупные размеры ядра у ряпушки и карася приводят к значениям ядерно-цитоплазменного отношения в клетках, сравнимого с его пропорциями у других видов рыб (Житенева и др., 2004). Изменения объема ядер в условиях умеренной и экстремальной гипоксии аналогичны изменениям объемов эритроцитов, что согласуется с данными А.Ю. Андреевой (2014).

Кроме карася, все эти рыбы относятся к видам, достаточно требовательным к содержанию кислорода в среде. Как известно, количество крови и количество эритроцитов в крови рыб меньше, чем у высших позвоночных, а лейкоцитов, как правило, больше. Это связано, с одной стороны, с пониженным обменом рыб, а с другой — с необходимостью усилить защитные функции крови, так как окружающая среда изобилует болезнетворными организмами. В среднем, в 1 мм³ крови количество эритроцитов составляет: у приматов — 9.27×10^6 кл; пресноводных костистых рыб — 1.71×10^6 кл. Количество эритроцитов в периферической крови у рыб колеблется в широких пределах, в зависимости от подвижности рыб: у карпа — $0.84\text{--}1.89 \times 10^6$ кл/мм³, щуки — 2.08×10^6 кл/мм³ (Моисеев и др., 1981).

Количество гемоглобина в организме рыб также значительно меньше, чем у наземных позвоночных, оно колеблется в зависимости от сезона, гидрохимического режима водоема, условий пита-

ния. Ускорение темпа роста рыб коррелирует с повышенной обеспеченностью их организма гемоглобином (Моисеев и др., 1981).

Способность гемоглобина крови извлекать кислород из воды у разных рыб неодинакова. У быстро плавающих рыб — макрели, трески, форели, гемоглобина в крови много, и они очень требовательны к содержанию кислорода в окружающей воде. У многих морских придонных рыб, а также угря, карпа, карасей и некоторых других, наоборот, гемоглобина в крови мало, но он может связывать кислород из среды даже с незначительным количеством кислорода (Моисеев и др., 1981).

Чувствительность рыб к изменениям температуры воды также связана со свойствами гемоглобина: при повышении температуры воды потребность организма в кислороде увеличивается, но способность гемоглобина связывать его падает. Подвижность рыб оказывает прямое влияние на количество эритроцитов. Пелагические, активно мигрирующие виды практически всегда обладают высокой кислородной емкостью крови. Бентосные, малоподвижные виды наоборот имеют низкий уровень пигмента и низкое количество красных кровяных клеток. Эта закономерность была подтверждена в работах ряда авторов (Kakuno et al., 1996; Soldatov, 1997). Некоторые антарктические виды рыб, которые обладают низкой двигательной активностью и обитают в переохлажденной среде (-1.8°C), не имеют гемоглобина и эритроцитов в крови (Patersen et al., 2003). Установлено, что кислородная емкость крови в преднерестовый период и в начале икрометания существенно снижается (Кириллов, 2008). Наоборот, к концу нереста и в посленерестовый период (2–3 месяца), заметно увеличивается количество крови, ее кислородная емкость за счет повышения концентрации гемоглобина и количества циркулирующих эритроцитов (Magill et al., 2004; Maslova et al., 1988; Diprisco, 1997).

Насыщенность среды кислородом является одним из основных факторов, определяющих жизнедеятельность организмов в водной среде. Для многих донных рыб, обитающих в слоях воды с ограниченным водообменом, состояние гипоксии является функционально нормальным, и компенсируется реорганизацией метаболических процессов, направленных на оптимизацию общих энергетических затрат. В большинстве случаев она проявлялась в увеличении объема эритроцитов в условиях внешнего дефицита кислорода (Soldatov, Parfenova, 2001). Так у рыб, обитающих в экстремальных условиях гипоксии, наблюдали увеличение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита в периферической крови (Javed, Usmani, 2015; Kakuno et al., 1996). Если снижение концентрации кислорода в окружающей среде не достигало экстремальных значений, реакция могла быть либо слабо выражена, либо вообще отсутствовать. Механизм обнаруженных изменений может быть связан с изменением соотношения эритропоэза/деструкции клеток красной крови, резервированием или выбросом эритроцитов из депо крови или изменением осмотического давления крови (Figuera, Perez, 1984).

Положительная корреляция была обнаружена между интенсивностью эритропоэза у рыб и температурой окружающей среды (в диапазоне толерантных для вида температур). Это сопровождалось укорочением митотического цикла и повышением пролиферации эритроидных клеток. При температуре за пределами этого диапазона процессы эритропоэза подавлялись. Различные варианты экспериментальной гипоксии и анемии также активируют пролиферацию незрелых эритроидных элементов и производство эритроцитов гемопоэтической тканью (Hardig, Hoglund, 1983).

Солдатовым А.А. (Soldatov, 2005) показано, что в условиях гипоксии количество окисленного пигмента (метгемоглобина) снижается. Уменьшение уровня метгемоглобина в эритроцитах связывают с увеличением резистентности циркулирующих эритроцитов к осмотическому шоку в условиях экспериментальной гипоксии. Увеличение его концентрации в процессе оксигенации пигмента может вызывать перекисное окисление липидов в клетках, что влияет на состояние клеточных мембран (Kawatsu et al., 1991, Soldatov, 2001).

Температура обладает довольно выраженным физиологическим действием на живой организм (Голованов, 2014). Она напрямую влияет на кислородную емкость крови. Повышение температуры усиливает метаболические процессы в организме, концентрацию гемоглобина и количество эритроцитов в крови, а ее понижение — противоположную картину (Lecklin, Nikinmaa, 1998; Serpunin, Likhatchyova, 1998; Soldatov, 2005).

Температура оказывает влияние на метаболизм липидов в клетках, что отражается в изменении вязкости клеточных мембран. При воздействии низких температур плазматические мембраны эритроцитов становятся более текучими, а под действием высоких температур — обладают более жесткой структурой (Silkin et al., 2012).

Температура также влияет на осмолярность плазмы крови. У пресноводных рыб акклимация к низким температурам вызывает снижение осмолярности плазмы крови, а к высоким — сначала про-

исходит некоторое повышение осмолярности плазмы крови, а затем осмолярность принимает постоянные значения и не изменяется при дальнейшем повышении температуры (Nordlie, 2009).

Анализ индекса формы (I_{ϕ}) эритроцитов показал, что наибольший показатель наблюдается у судака и налима, наименьший – у карпа (Табл.1.). Разброс значений у судака больше, чем у налима. Ядерно-цитоплазменное отношение (Я/ц отношение) максимально у налима, минимально — у жереха (табл.1.).

Анализ связи между индексом формы и особенностями экологии исследованных видов рыб (тип питания; отношение к кислороду; подвижность; местообитание) показал зависимость индекса формы от двух исследованных факторов — типа питания и отношения к кислороду. В группе хищных рыб значения индекса формы, в целом, несколько выше, что говорит о более округлой форме, и, следовательно, несколько меньшей их емкости. Меньшая емкость эритроцитов в свою очередь обуславливает возможность переносить меньшее количество кислорода, чем у представителей других групп. Меньшая емкость в таком случае компенсируется более высоким содержанием эритроцитов в кровеносном русле (Анисимова, Лавровский, 2003; Бикташева, Латыпова, 2013).

Среди всех исследованных видов рыб, по форме особо выделяются эритроциты карпа. Они имеют резко эллипсоидную форму, с существенным преобладанием длины клетки над ее шириной ($I_{\phi} = 0,4$). В целом, можно отметить, что у рыб, способных обитать в воде относительно слабо насыщенной кислородом, показатели индекса формы немного ниже, чем у рыб, которым требуется хорошее насыщение воды кислородом.

Анализ состава клеток красной крови пресноводных костистых рыб Рыбинского водохранилища показал, что доли зрелых и незрелых клеток в большей степени зависят от типа питания. В целом в крови у хищных рыб, вне зависимости от их типа (активный или засадный) наблюдали более высокий показатель доли зрелых эритроцитов. Возможно, это связано с составом потребляемой пищи (Никольский, 1963). В то же время связи между местообитанием, подвижностью рыб и относительным количеством зрелых эритроцитов не прослеживается. Вместе с тем, у рыб, чувствительных к недостатку кислорода, наблюдаются более низкие значения количества зрелых эритроцитов, чем у групп толерантных к недостатку кислорода. Возможно, это связано с тем, что количество эритроцитов все же оказывает меньшее влияние на чувствительность рыбы к гипоксии, чем кислородная емкость эритроцитов. У видов наиболее чувствительных к недостатку кислорода, низкая доля зрелых форм эритроцитов компенсируется крупными размерами клеток.

Кластерный анализ показал, что объем эритроцитов зависит от двух факторов: подвижности рыб и их отношения к кислороду. Как отмечается во многих литературных источниках, потребности в кислороде часто коррелируют с подвижностью рыб (Javed, Usmani, 2014; Soldatov, 2001). Рыбы, отличающиеся высокой подвижностью, имеют высокие запросы к содержанию кислорода в среде (голец, ряпушка). Рыбы, для которых характерна низкая подвижность, обычно менее требовательны к содержанию кислорода (лινь, бычок) (Рис. 1). Ядерно—цитоплазменное отношение и индекс формы клеток также в большей степени зависят от потребностей рыб в кислороде: рыбы, комфортно чувствующие себя при содержании кислорода в среде выше 5 мг/л (снеток, жерех, голец, подкаменщик, чехонь и др.), оказались в одно группе (Рис. 2). Анализ всех трех показателей также в наибольшей степени показывает на зависимость их от потребностей рыб в насыщении воды кислородом (Рис. 4).

Лейкоциты. Исследование лейкоцитов периферической крови 25 видов пресноводных костистых рыб Рыбинского водохранилища показало, что клетки белой крови представлены агранулоцитами и гранулоцитами. Агранулоциты представлены, в основном, лимфоцитами (от 52 до 93%), исключение составляет подкаменщик — в его крови доля лимфоцитов не превышала 33%, и моноцитами, количество которых было невелико и не превышало у всех видов 3% (исключение составили щиповка и подкаменщик, у них доля этих клеток составляла 4.2 и 3.8%, соответственно). Гранулоциты в периферической крови представлены незрелыми (миелоциты и метамиелоциты) и зрелыми (палочкоядерные и сегментоядерные) формами. У всех исследованных видов в крови идентифицировали в основном нейтрофилы, и у 6 видов — эозинофилы (не более 2.2%) (Табл. 3). Учитывали также тромбоциты, которые у рыб являются ядерными клетками, и имеют несколько отличающихся по внешнему виду морфотипов: голоядерные, веретенновидные, округлые (Иванова, 1983; Волынкин, 2008).

Как видно из таблицы, более 80% лимфоцитов содержится в крови хищных видов рыб (судак, берш, окунь, налим, сом, щука) а также ерша и гольца усатого, которые обитают в придонном слое воды и являются бентофагами. Наименьшая доля лимфоцитов (менее 35%) у подкаменщика, также обитающего в придонном слое, и, как и голец, чувствительного к насыщению воды кислородом (Табл. 3). Доля лимфоцитов у других исследованных видов колеблется в диапазоне 50–70%.

Таблица 3. Состав лейкоцитов периферической крови костистых рыб Рыбинского водохранилища и его притоков

Виды рыб	Лимфоциты	Моноциты	Гемоцитобласты	Миелоциты	Метамиелоциты	ПЯН	СЯН	Эозинофилы
Отр. Окунеобразные								
Речной окунь	92.1 ± 0.2	0	4.1 ± 1.0	3.3 ± 1.5	0	0.6 ± 0.0	0.0	0
Обыкновенный судак	93.7 ± 0.7	0	3.7 ± 1.1	2.7 ± 2.8	0	0.3 ± 0.6	0.0	0
Волжский судак, берш	81.7 ± 4.7	0	5.3 ± 3.2	11.9 ± 2.6	0	0	0.0	0
Обыкновенный ерш	90.0	2.0	0	1.0	7.0	0	0.0	0
Тупорылый бычок	70.3 ± 4.3	2.4 ± 1.2	1.9 ± 1.0	4.2 ± 2.7	9.0 ± 2.5	12.1 ± 5.3	0.0	0
Отр. Карпообразные								
Лещ	56.1 ± 5.5	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	15.8 ± 4.5	16.3 ± 3.5	11.3 ± 3.1	0.3 ± 0.5	0
Синец	55.7 ± 7.1	2.5 ± 3.5	2.5 ± 3.5	5.8 ± 1.2	20.0 ± 0.0	14.7 ± 1.2	0.0	0
Уклея	78.4 ± 12.6	1.3 ± 1.7	2.7 ± 1.1	9.0 ± 5.4	6.4 ± 9.6	2.1 ± 3.7	0.0	0
Жерех	63.1 ± 17.8	2.9 ± 2.2	1.6 ± 0.3	2.9 ± 2.2	15.8 ± 8.2	12.8 ± 6.0	0.7 ± 1.0	0
Пескарь	51.9 ± 16.8	2.2 ± 1.6	0.5 ± 0.8	3.2 ± 1.4	8.17 ± 1.0	29.6 ± 14.7	2.2 ± 3.1	2.2 ± 1.5
Линь	79.1	0.0	4.5	0	3.0	11.9	0.0	1.5
Язь	64.7 ± 1.6	1.8 ± 1.0	2.4 ± 0.9	9.8 ± 7.0	12.3 ± 1.3	9.1 ± 7.3	0.0	0
Карась серебряный	72.5 ± 1.6	0	0	12.2 ± 1.6	10.1 ± 1.6	2.1 ± 0.61	2.0 ± 0.5	0
Белоглазка	68.8	0.6	1.9	25.3	1.3	0	0.0	1.9
Голец усатый	85.2 ± 3.9	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.9	2.8 ± 0.7	3.7 ± 0.9	5.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Обыкновенная щиповка	54.9 ± 7.2	4.2 ± 1.8	6.1 ± 2.3	7.3 ± 1.0	8.2 ± 6.3	17.0 ± 5.6	1.2 ± 1.5	1.2 ± 1.1
Плотва обыкновенная	75.8 ± 5.9	1.0	4.0	3.2	6.3	3.2	0	0
Отр. Скорпенообразные								
Обыкновенный подкаменщик	32.7 ± 3.2	3.8 ± 0.8	0	0	28.8 ± 2.5	34.6 ± 3.3	0	0
Отр. Трескообразные								
Налим	88.7 ± 6.3	0	8.8 ± 6.7	1.9 ± 0.8	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.6	0	0
Сом	80.0 ± 4.7	1.1 ± 1.1	4.9 ± 0.8	3.3 ± 2.1	13.8 ± 2.5	9.8 ± 2.7	0	0
Отр. Лососеобразные								
Снеток	82.2 ± 5.7	0	3.7 ± 0.1	11.7 ± 4.9	0.9 ± 0.0	0	0	1.4 ± 0.7
Пелядь	71.8 ± 11.8	0	2.7 ± 0.8	12.7 ± 7.9	3.8 ± 0.7	7.0 ± 3.9	0	2.0 ± 0.1
Европейская ряпушка	66.7	0	0	16.7	16.7	0	0	0
Отр. Сельдеобразные								
Тюлька	72.6 ± 5.9	0.8 ± 1.8	2.2 ± 2.2	12.5 ± 2.4	10.9 ± 5.0	1.0 ± 1.4	0	0
Отр. Щукообразные								
Обыкновенная щука	88.9 ± 8.9	0.3 ± 0.5	3.3 ± 3.1	5.9 ± 6.1	0.5 ± 0.5	1.0 ± 0.5	0	0

Примечание: ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы

Гранулоциты в периферической крови рыб представлены в основном незрелыми формами клеток — миелоцитами и метамиелоцитами. Их относительное количество минимально у хищных Окунеобразных (кроме берша), линя, плотвы и пескаря (Карпообразные), налима и щуки. Зрелые нейтрофилы в большей доле обнаружены в крови подкаменщика и пескаря (30–35%), а у большинства Карпообразных колебались в пределах 0–17% (Табл. 3). Доля гранулоцитов у лососеобразных составляла 12–33%, у тюльки — не достигала 7%.

Следует отметить, что в крови рыб гранулоциты присутствуют в основном в форме незрелых клеток и палочкоядерных нейтрофилов. Сегментоядерные клетки обнаружены лишь у 6 видов (24%). Присутствие незрелых клеток в крови рыб не считается патологией (Головина, 2007).

Так как соотношение лейкоцитов в периферической крови, также, как и гуморальные факторы неспецифического иммунитета, зависит от множества факторов, таких как физиологическое состояние, сезон года, тип питания, возраст, состояние окружающей среды (Лапирова, Флерова, 2013, 2015), нельзя сделать однозначных выводов о связи лейкоцитарной формулы с каким-либо одним из них, вместе с тем, можно сделать предположение, что у хищных видов рыб, а также оксифильных рыб кровь носит более выраженный лимфоидный характер.

Кластерный анализ сходства лейкограмм исследованных видов рыб позволяет выделить несколько групп: щиповка, синец, лещ — язь, жерех, бычок — окунь, судак, щука, налим, голец, ерш — сом, линь — снеток, берш — пелядь, карась, тюлька — плотва, уклейка — ряпушка, белоглазка — подкаменщик (Рис. 5). Анализ дендрограммы показывает, что чаще всего в одну сходную группу попадают виды рыб, имеющие одинаковые потребности или предпочтения к насыщению воды кислородом. Ранее было показано, что от насыщения среды кислородом и способности рыб переносить гипоксию зависят соотношение лейкоцитов в головном и туловищном отделах почек пресноводных и морских рыб (Nazarova, Zobotkina, 2010).

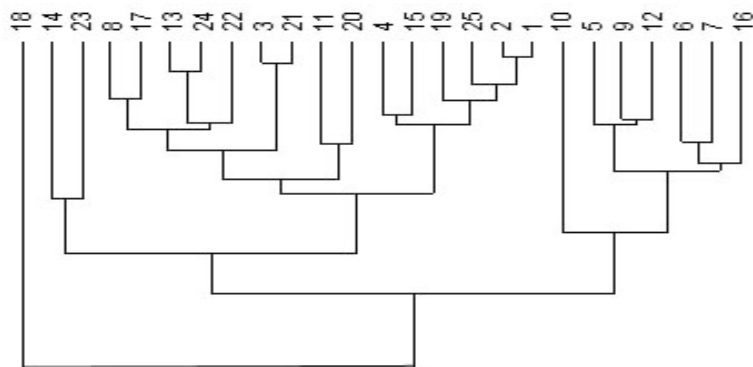


Рис. 5. Дендрограмма сходства лейкоцитарных профилей некоторых видов костистых рыб Рыбинского водохранилища.

Отр. Окунеобразные: 1 — речной окунь, 2 — обыкновенный судак, 3 — берш, 4 — обыкновенный ерш, 5 — тупорылый бычок; Отр. Карпообразные: 6 — лещ, 7 — синец, 8 — уклейка, 9 — жерех, 10 — пескарь, 11 — линь, 12 — язь, 13 — карась, 14 — белоглазка, 15 — голец усатый, 16 — обыкновенная щиповка, 17 — плотва обыкновенная; Отр. Скорпенообразные: 18 — обыкновенный подкаменщик; Отр. Трескообразные: 19 — налим; Отр. Сомообразные: 20 — сом; Отр. Лососеобразные: 21 — снеток, 22 — пелядь, 23 — европейская ряпушка; Отр. Сельдеобразные: 24 — тюлька; Отр. Щукообразные: 25 — щука.

Тромбоциты. Доля тромбоцитов в крови костистых рыб Рыбинского водохранилища колеблется от 23 до 83%. Содержание этого типа клеток в периферической крови не связано с систематическим положением вида, между представителями внутри одного отряда колебания показателя выражены сильнее, чем между представителями разных отрядов (Рис. 6). Наименьшая доля тромбоцитов в крови отмечена у окуня и белоглазки, а наибольшая — у гольца. Тромбоциты участвуют в реакциях свертывания крови (Волынкин, 2008). Сведения об их количестве, форме, образовании достаточно противоречивы. Считают, что количество тромбоцитов, скорее всего, связано с образом жизни рыб, местообитанием, сезоном года, качеством среды обитания (Головина, Тромбицкий, 1989; Житенева и др., 2003).

Показано, что доля тромбоцитов изменяется у окуней, обитающих в озерах с разным уровнем pH (Микряков и др., 2001), при действии токсикантов или загрязнении среды (Zobotkina et al., 2009, Lapirova, Zobotkina, 2010). Считают, что количество тромбоцитов повышается в периоды активного лейко- и эритропоэза (Житенева и др., 2003).

Так как усиление эритропоза имеет сезонную динамику, либо происходит в посттравматический период, возможно, усиление эритропоза в этот период играет защитную роль.

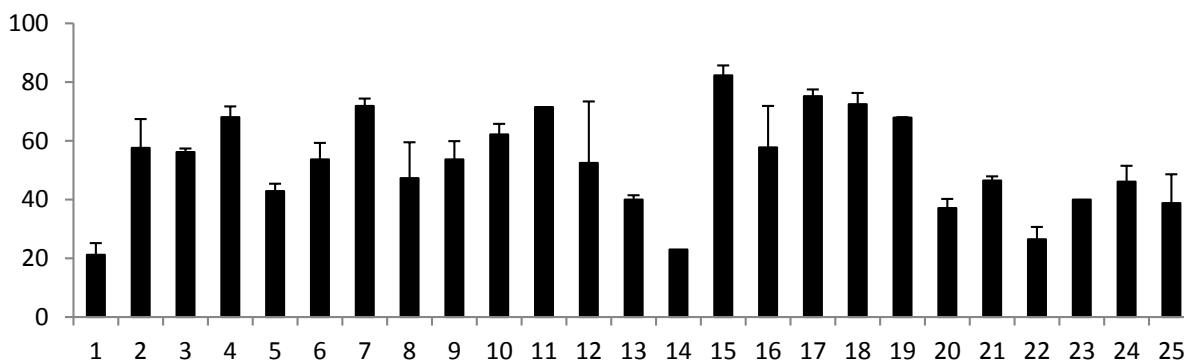


Рис. 6. Относительное количество тромбоцитов в периферической крови костистых рыб Рыбинского водохранилища (%).

Отр. Окунеобразные: 1 — речной окунь, 2 — обыкновенный судак, 3 — берш, 4 — обыкновенный ерш, 5 — тупорылый бычок; отр. Карпообразные: 6 — лещ, 7 — синец, 8 — уклейка, 9 — жерех, 10 — пескарь, 11 — линь, 12 — язь, 13 — карась, 14 — белоглазка, 15 — голец усатый, 16 — обыкновенная щиповка, 17 — плотва обыкновенная; отр. Скорпенообразные: 18 — обыкновенный подкаменщик; отр. Трескообразные: 19 — налим; отр. Сомообразные: 20 — сом; отр. Лососеобразные: 21 — снеток, 22 — пелядь, 23 — европейская ряпушка; отр. Сельдеобразные: 24 — тюлька; отр. Щукообразные: 25 — щука.

Дендрограмма сходства долей тромбоцитов в периферической крови рыб показывает разделение всех видов на 4 группы: 1-я — белоглазка, окунь, пелядь; 2-я — карась, ряпушка, щука, сом, бычок, уклейка, снеток, тюлька; 3-я — лещ, жерех, язь, берш, судак, щиповка, пескарь; 4-я — синец, линь, подкаменщик, плотва, ерш, налим, голец (Рис. 7). Вместе с тем, вопрос о преимущественном влиянии какого-либо фактора на долю тромбоцитов в крови остается нерешенным в первую очередь из-за недостаточности литературных данных о тромбоцитах рыб. Сходные доли тромбоцитов оказываются у активных и засадных хищников и донных, двигателью неактивных бентофагов (судак и лещ, снеток и сом). С другой стороны, в одну группу попадают рыбы, имеющие сходные требования к насыщенности среды кислородом. По-видимому, кислород, как универсальный окислитель, участвующий во всех биохимических реакциях как акцептор электронов, возможно, играет более глубокую роль в адаптации организма рыб к среде обитания.

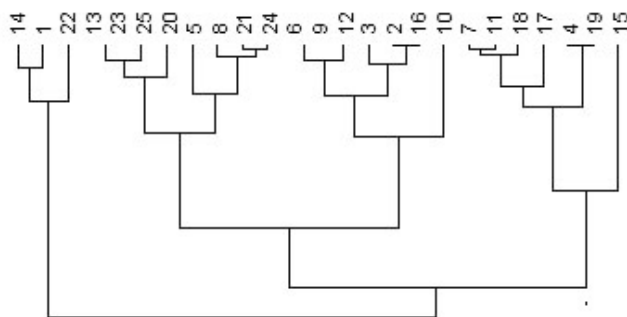


Рис. 7. Дендрограмма сходства доли тромбоцитов в периферической крови рыб.

Отр. Окунеобразные: 1 — окунь, 2 — судак, 3 — берш, 4 — ерш, 5 — бычок; отр. Карпообразные: 6 — лещ, 7 — синец, 8 — уклейка, 9 — жерех, 10 — пескарь, 11 — линь, 12 — язь, 13 — карась, 14 — белоглазка, 15 — голец усатый, 16 — обыкновенная щиповка, 17 — плотва обыкновенная; Отр. Скорпенообразные: 18 — обыкновенный подкаменщик; Отр. Трескообразные: 19 — налим; Отр. Сомообразные: 20 — сом; Отр. Лососеобразные: 21 — снеток, 22 — пелядь, 23 — ряпушка; Отр. Сельдеобразные: 24 — тюлька; Отр. Щукообразные: 25 — щука.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на показатели клеток красной и белой крови у рыб в большей степени оказывает влияние требовательность конкретного вида рыб к насыщению среды кислородом. Наибольшие размеры и объем клеток и ядер наблюдали у высокоподвижных, высокочувствительных к недостатку кислорода в среде рыб и рыб, обитающих в условиях низкой насыщенности среды кислородом, что компенсирует гипоксию среды. Наибольшие значения индекса формы (наиболее округлые клетки) отмечали у рыб чувствительных к недостатку кислорода, наименьшие — в группе хищных рыб. Наибольшие отно-

сительные количества зрелых эритроцитов отмечены в периферической крови хищных рыб, их число также возрастает в условиях низкого насыщения среды кислородом. Лейкограммы хищных видов рыб и рыб, требующих высокого уровня насыщения воды кислородом, имеют более выраженный лимфоидный характер. Зависимость доли тромбоцитов от какого-либо фактора не выявлена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.Ю. Морфофункциональные характеристики эритроцитов *Scorpaena porcus* L. в условиях гипоксии (эксперименты *in vitro*). Автореф. дисс. на соиск. ... к.б.н. С-Пб, 2014. 24 с. [Andreeva A.Yu. Morfofunktsionalnye kharakteristiki eritrotsitov *Scorpaena porcus* L. v usloviyakh gipoksii (eksperimenty *in vitro*). Avtoref. Dis. na soisk. ... k.b.n. S-Pb, 2014. 24 s. [Andreeva A.Yu. Morphological and functional characteristics of red blood cells of *Scorpaena porcus* L. under hypoxic conditions (experiments *in vitro*). Thesis.Ph.D. Saint-Petersburg, 2014. 24 p.] In Russian.
- Анисимова И.М., Лавровский В.В. Ихтиология. М: Высшая школа, 1983. 255 с. Anisimova I.M., Lavrovskiy V.V. Ikhtiologiya. M.: Vysshaya shkola, 1983. 255 s. [Anisimova I.M., Lavrovskii V.V. Ichthyology. M.: High school, 1983. 255 p.] In Russian.
- Антипова П.С. Сезонные и возрастные изменения морфологического состава крови карпа // Вопр. ихтиологии. 1954. Т. 2. С. 120–122. Antipova P.S. Sezonnnye i vozrastnyie izmeneniya morfologicheskogo sostava krovi karpa // Voprosy Ichtiologii. 1954. T.2. S. 120–122. [Antipova P.S. Seasonal and age-related changes of the morphological structure of blood carp // J. Ichthyology. Vol. 2. P. 120–122.] In Russian.
- Атлас пресноводных рыб России: в 2 т. / под. ред. Ю.С. Решетникова. М: Наука, 2003. Т. 1, 2. Atlas presnovodnykh ryb Rossii. Yu.S. Reshetnikov (red.). M.: Nauka, 2003. T. 1, 2. [Atlas of freshwater fish of Russia. Yu.S. Reshetnikov (ed.). M.: Science, 2003. Vol. 1, 2.] In Russian.
- Бикташева Ф.Х., Латыпова Г.Ф. Гематологические показатели представителей хищных рыб природного парка озера Асылыкуль // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013. № 1(39). С. 72–73. Biktasheva F.H., Latypova G.F. Gematologicheskie pokazateli predstavitelei khishchnykh ryb prirodnogo parka-ozera Asylykul' // Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2013. №1(39). S. 72–73. [Biktasheva F.H., Latypova G.F. Hematological indices of representatives of predatory fish inhabiting the nature park-lake Asylykul' // Proceedings of the Orenburg State Agrarian University. 2013. No. 1(39). P. 72–73.]
- Волынкин Ю.Л. Морфологический статус как отражение адаптационных возможностей организма рыб. Автореф. дисс. ... д.б.н. Москва, 2008, 48 с. Volynkin Yu.L. Morfofiziologicheskii status kak otrazhenie adaptatsionnykh vozmozhnostei organizma ryb. Avtoref. diss. ... d.b.n. Moskva, 2008. 48 s. [Volynkin Yu.L. Morphophysiological status as a reflection of the organism's adaptive capacity of fish. Thesis. ... Dr. Biol. Sci.] In Russian.
- Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М: Полиграф-Плюс, 2013. 300 с. Golovanov V.K. Temperaturnye kriterii zhiznedeyatel'nosti presnovodnykh ryb. M.: Poligraf-Plus, 2013. 300 s. [Golovanov V.K. Temperature criteria of the life activity of freshwater fish. M.: Polygraph-Plus, 2013. 300 p.] In Russian.
- Головина Н.А., Тромбицкий И.Д. Гематология прудовых рыб. Кишинев: Штеница, 1989. 156 с. Golovina N.A., Trombitskii I.D. Gematologiya prudovykh ryb. Kishinyev: Shtinitsa, 1989. 156 s. [Golovina N.A., Trombitskii I.D. Hematology of pond fish. Kishinev: Shtinitsa, 1989. 156 p.] In Russian.
- Головина Н.А. Ихтиопатология. М: Мир, 2007. 448 с. Golovina N.A. Ikhtiopatologiya. M.: Mir, 2007. 448 s. [Golovina N.A. Ichthyopathology. M.: Peace, 2007. 448 p.] In Russian.
- Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Основы ихтиогематологии (в сравнительном аспекте). Ростов-на-Дону: Эверест, 2004. 312 с. Zhiteneva L.D., Makarov Y.V., Rudnitskaya O.A. Osnovy ikhtiohematologii (v sravnitel'nom aspekte). Rostov-na-Donu: Everest, 2004. 312 s. [Zhiteneva L.D., Makarov Y.V., Rudnitskaya O.A. The Foundation of Ichthyogematology (in comparative aspect). Rostov-on-Don: Everest, 2004. 312 p.] In Russian.
- Житенева Л.Д., Макаров Э.В., Рудницкая О.А. Тромбоциты рыб и других групп позвоночных. Ростов-на-Дону: Изд-во СКНЦ ВШ, 2003. 71 с. Zhiteneva L.D., Makarov Y.V., Rudnitskaya O.A. Trombotsity ryb i drugikh grupp pozvonochnykh. Rostov-na-Donu: Izd-vo SKNTs VSh, 2003. 71 s. [Zhiteneva L.D., Makarov Y.V., Rudnitskaya O.A. The thrombocytes of fish and others group of vertebrate. Rostov-on-Don: PH NCSC HSc, 2003. 71 p.] In Russian.
- Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. М: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 184 с. Ivanova N.T. Atlas kletok krovi ryb. M.: Lyegkaya i pishchevaya promyshlennost', 1983. 184 s. [Ivanova N.T. Atlas of fish blood cells. M.: Light and food industry, 1983. 184 p.] In Russian.
- Кириллов В.Н. Морфофункциональные особенности адаптации молоди белого амура к различным уровням солености воды // Вестник Астраханского ГТУ. 2008. № 3. С. 68–70. Kirillov V.N. Morfofunktsionalnye osobennosti adaptatsii molodi belogo amura k razlichnym urovnym solenosti vody // Vestnik Astrakhanskogo GTU. 2008. № 3. S. 68–70. [Kirillov V.N. Morphological and functional features of adaptation of juvenile of grass carp to various levels of water salinity // Herald of the Astrakhan STU. 2008. No. 3. P. 68–70.] In Russian.
- Лапирова Т.Б., Флерова Е.А. Сравнительный анализ некоторых иммунофизиологических параметров крови щуки *Esox lucius* (L.) и судака *Stizostedion lucioperca* (L.) // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. 2013. №1. С. 140–146. Lapirova T.B., Flerova E.A. Sravnitel'nii analiz nekotorykh immunofiziologicheskikh parametrov krovi shchuki *Esox lucius* (L.) i sudaka *Stizostedion lucioperca* (L.) // Vestnik Astrakhanskogo GTU. Ser. Rybnoe hozyaiistvo. 2013. № 1. S. 140–146. [Lapirova T.B., Flerova E.A. Comparative analysis of some immunophysiological

- ical parameters of blood in pike *Esox lucius* (L.) and zander *Stizostedion lucioperca* (L.) // Herald of the Astrakhan STU. 2013. № 1. P. 140–146.] In Russian.
- Лапирова Т.Б., Флерова Е.А. Физиолого-биохимическая характеристика крови леща (*Abramis brama* L.) Рыбинского водохранилища // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2015. № 2. С. 83–88. Lapirova T.B., Flerova E.A. Fiziologo-biokhimicheskaya kharakteristika krovi leshcha (*Abramis brama* L.) Rybinskogo vodokhranilishcha // Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2015. № 2. S. 83–88. [Lapirova T.B., Flerova E.A. Physiological and biochemical characteristics of blood of bream (*Abramis brama* L.) from the Rybinsk reservoir // Herald of Michurin SAU. 2015. No. 2. P. 83–88.] In Russian.
- Микряков В.Р., Балабанова Л.В., Заботкина Е.А. и др. Реакция иммунной системы рыб на загрязнение воды токсикантами и закисление среды. М.: Наука, 2001. 126 с. Mikryakov V.R., Balabanova L.V., Zobotkina E.A. i dr. Reaktsiya immunnoii sistemy ryb na zagryazneniie vody toksikantami i zakislenie sredy. M.: Nauka, 2001. 126 s. [Mikryakov V.R., Balabanova L.V., Zobotkina E.A. et al. The reaction of the immune system of fish on water pollution to toxicants and acidification. M.: Science, 2001. 126 p.] In Russian.
- Моисеев П. А., Анизова Н.А., Куранова И.И. Ихтиология. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 384 с. Moiseev P.A., Anizova N.A., Kuranova I.I. Ikhtiologiya. M.: Lyegkaya i pishchevaya promyshlennost', 1981. 384 s. [Moiseev P.A., Anizova N.A., Kuranova I.I. Ichthyology. M.: Light and food industry, 1981. 384 p.] In Russian.
- Никольский Г.В. Экология рыб. М.: Высшая школа, 1963. 370 с. Nikolskii G.V. Ekologiya ryb. V.: Vysshaya shkola, 1963. 370 s. [Nikolskii G.V. Fish Ecology. M.: High School, 1963. 374 p.] In Russian.
- Яхненко В.М., Клименков И.В. Особенности состава и структуры клеток крови рыб пелагиали и побережья озера Байкал // Известия РАН. Сер. биологическая. 2009. №1. С.46–54. Yakhnenko V.M., Klimentov I.V. Oso-bennosti sostava i struktury kletok krovi ryb pelagiali i pribrezh'ya ozera Baikal // Izvestiya RAN. Ser. biologicheskaya. 2009. №1. S.46–54. [Yakhnenko V.M., Klimentov I.V. Features of the composition and structure of blood cells in fish of pelagic and coastal zone of Lake Baikal // Biology Bulletin. 2009. No. 1. P.46–54.] In Russian.
- Di Prisco G. Physiological and biochemical adaptations in fish to a cold marine environment // *Antarc. Commun.: Species, Struct. Surviv.* Battaglia: Cambridge Univ. Press (UK), 1997. P. 251–260.
- Figuera O., Perez J.E. Blood Adaptations to low oxygen concentrations in the fish *Bastrachoides manglae* // *Bol. Inst. Oceanogr. Venez.* 1984. Vol. 23. P. 163–168.
- Hardig J., Hoglund L.B. Autoradiography of erythrokinesis and multihemoglobins in juvenile *Salmo salar* L. at various respiratory gas regimes // *Acta Physiol. Scand.*, 1983. Vol. 76A. P. 27–34.
- Hsieh H.S., Jaffe E.R. The metabolism of methemoglobin in human erythrocytes // In book: *The Red Blood Cell*. New York: Acad. Press, 1975. P. 799–824.
- Javed M., Usmani N. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review // *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2015. Vol. 85. No. 4. P. 889–900.
- Kakuno Á.A., Sezaki Á., Ikeda Á.Y. Comparative hematology among 33 fish species of ostaryophysi // *Bull. Nat. Res. Inst. Fish. Sci.* 1996. No. 8. P. 15–27.
- Kawatsu H., Yamawki T., Miyamori E. In vitro hemolysis and methemoglobin formation in common carp erythrocytes, induced by hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 1991. Vol. 57. P. 2299–2305.
- Lapirova T.B., Zobotkina E.A. Comparative analysis of the indices of immunophysiological state in bream (*Abramis brama* (L.)) From parts of the Rybinsk reservoir with different extents of pollution // *Inland Water Biology*. 2010. V. No. 2. P. 181–186.
- Lecklin T., Nikinmaa M. Erythropoiesis in Arctic charr is not simulated by anaemia // *J. Fish. Biol.*, 1998. Vol. 53. P. 1169–1177.
- Magill S.H., Sayer M.D.J. The effect of reduced temperature and salinity on the blood physiology of juvenile Atlantic cod // *J. Fish Biology*. 2004. No. 64. P. 1193–1205.
- Maslova M.N., Soldatov A.A., Tavrovskaya T.V. Seasonal dynamics of red blood system status in some Black Sea fish // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1988. Vol. 24. P. 516–21.
- Nazarova E.A., Zobotkina E.A. Specific features of the composition of leucocytes in the kidneys of some species of freshwater and marine bony fishes // *Inland Water Biology*. 2010. Vol. 3. No. 2. P. 187–192.
- Nordlie F.G. Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: a review // *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 2009. No. 19. P. 441–564.
- Paterson B.D., Rimmer M.A., Meikle G.M., Semmens G.L. Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcaifer*, to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma // *Aquaculture*. 2003. No. 218(1). P. 717–728.
- Serpunin G.G., Likhatchyova O.A. Use of the Ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs // *Acta Vet. Brno*. 1998. Vol. 67. P. 339–345.
- Silkin Y.A., Silkina E.N., Zabelinskii S.A. Peculiarities of the phospholipid and fatty acid composition of erythrocyte plasma membranes of the Black Sea fish // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2012. Vol. 48. No. 1. P. 43–51.
- Soldatov A.A. Oxygen-dissociation properties of blood and composition of intraerythrocytic medium in marine fish with different motor activity // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1997. Vol. 33. P. 607–614.
- Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2005. Vol. 41. No. 3. P. 272–281.

- Soldatov A.A., Parfenova I.A. The methemoglobin blood level and stability of circulating erythrocytes of the rockfish *Scorpaena porcus* to osmotic shock under conditions of experimental hypoxia // J. Evol. Biochem. Physiol. 2001. Vol. 37. No. 6. P. 622–625.
- Tamburrini M., Avino R.D., Fago A., Carratore V., Kunzmann A., Di Prisco G. The Unique Hemoglobin System of an Antarctic Migratory Teleost. Structure and Function of the Three Components // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 23780–23785.
- Zabotkina E.A., Lapirova T.B., Nazarova E.A. Influence of cadmium ions on some morphofunctional and immunophysiological parameters of perch (*Perca fluviatilis*, Perciformes, Percidae) underyearlings // J. Ichthyology. 2009. Vol. 49. No. 1. P. 111–118.
- Yakhnenko V.M., Klimenlov I.V. Specific features Of Blood Cell Composition And Structure In Fishes From The Pelagial And Coastal Zones Of Lake Baikal // Biology Bulletin. 2009. Vol. 36. № 1. P. 37–44.

ECOLOGICAL PLASTICITY OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF FRESHWATER BONY FISH

E. A. Zabotkina¹, T. B. Lapirova¹, V. E. Serednyakov², T. A. Nesterova²

¹ I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl, Nekouz, Russia, e-mail: zabel@ibiw.yaroslavl.ru

² P. G. Demidov Yaroslavl State University
150000 Yaroslavl, Matrosova Ave, 9, Russia, e-mail: serednyakov@mail.ru

The dependence of hematological parameters in fishes of the Rybinsk reservoir by environmental factors such as nutrition, mobility etc. It is shown that most of indicators of the red blood cells (size, shape index and the nucleus/cytoplasm and immature/mature ratio of erythrocytes) and the white blood cells are dependent from sensitivity fish to the environment saturation of oxygen.

Keywords: hematological parameters, red blood cells, white blood cells, environmental factors, fish, Rybinsk reservoir

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЦЕССОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ У РЫБ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА (ОБЗОР)

В. В. Кузьмина

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru*

В обзоре приведены результаты многолетних исследований активности и различных характеристик пищеварительных ферментов рыб Рыбинского водохранилища, относящихся по типу питания к разным экологическим группам. На фоне общих для позвоночных закономерностей выявлены особенности, обусловленные обитанием в водной среде, эвритермностью и характером питания рыб.

Ключевые слова: рыбы, Рыбинское водохранилище, пищеварение, ферменты.

В связи со сложностью определения спектра и сезонной динамики питания, а также рационов рыб, особенно планкто- и бентофагов, в последние десятилетия предпринимаются попытки оценить условия их питания по данным, касающимся активности пищеварительных ферментов. Возможность использования такого подхода обусловлена тем, что в целом ряде работ доказана зависимость активности пищеварительных гидролаз от спектра и интенсивности питания рыб (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Сорвачев, 1982; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005, 2008). Как известно, пищеварение — процесс, обеспечивающий начальные этапы ассимиляции пищи, осуществляющийся при участии различных ферментов, реализующих поэтапный гидролиз биополимеров до уровня резорбируемых субстанций (преимущественно мономеров), участвующих в метаболизме (Уголев, 1972). Общей закономерностью для большинства животных, в том числе и рыб, являются первоначальное переваривание пищи в кислой среде (так называемое пепсино-кислое пищеварение), последующий гидролиз и всасывание — в нейтральной. У безжелудочных рыб пепсино-кислое пищеварение отсутствует. В кишечнике и пилорических придатках, являющихся дериватами кишечника (Веригина, Жолдасова, 1982), происходит гидролиз биополимеров, а также абсорбция липидных, углеводных и белковых компонентов пищи, воды, минералов и биологически активных веществ (Уголев, Кузьмина, 1993).

В настоящее время принято различать три основных типа "собственного" пищеварения (внеклеточное, внутриклеточное и мембранное), а также два дополнительных — симбионтное пищеварение и индуцированный аутолиз (Уголев, 1972; Уголев, Кузьмина, 1993). У рыб, представлены все известные типы пищеварения, причем два дополнительных типа переведены в ранг основных (Кузьмина, 1996). Степень развития указанных механизмов у представителей разных таксономических групп рыб различна (Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, Gelman, 1997; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005; Kuz'mina, 2008). При этом у рыб, обладающих желудком с ярко выраженной кислотообразующей функцией (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993), индуцированный аутолиз может играть значительную роль (Кузьмина, 1993, 2000; Кузьмина, Скворцова, 2003; Kuz'mina, Golovanova, 2004).

Зависимость активности пищеварительных гидролаз от спектра и интенсивности питания рыб проявляется на всех этапах онтогенеза рыб (Коновалов, 1986; Ильина, Турецкий, 1987; Кузьмина, Гельман, 1998; Кузьмина, 2005). Наиболее ярко видовые различия выявляются при сопоставлении активности ферментов цепи гликозидаз (карбогидраз) и протеаз. У типичных бенто- и планктофагов (синец, плотва) активность кишечных гликозидаз при переходе от личиночных к мальковым этапам развития увеличивается (Kuz'mina, 1996; Кузьмина, Стрельникова, 2008). Активность протеаз у растительноядных рыб с возрастом, как правило, снижается, у ихтиофагов увеличивается (Barrington, 1957; Fange, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993). При этом для ихтиофагов характерна большая вариабельность активности пищеварительных ферментов, чем для бентофагов (Уголев, Кузьмина, 1993), а уровень протеолитической активности, как правило, коррелирует со скоростью роста рыб (Hidalgo et al., 1999). Для оценки влияния характера питания и состава пищи на пищеварительные ферменты у рыб разных видов целесообразно исследовать активность гликозидаз и протеаз (синонимы: протеиназ или пептидаз), обеспечивающих гидролиз углеводных и белковых компонентов пищи, в один и тот же период годового цикла.

Содержание основных энергетических компонентов в тканях объектов питания рыб разных экологических групп. Содержание основных энергетических компонентов в тканях потенциальных объектов питания рыб различно. Сухое вещество кормовых объектов бентофагов содержит от 38.7 до 68.7% белка. Олигохеты сем. Tubificidae содержат 46.2–63.0%, личинки комаров сем. Chironomidae — 53.9%, моллюски класса Gastropoda — 39.3–73.1%, класса Bivalvia (*Dreissena polymorpha*) — 41.3%

белка. Пища планктофагов содержит 35.5–45.0% белка по сухому веществу. Лишь в пище растительных рыб содержится значительно меньше белка: макрофиты состоят на 14.8–20.4% из белка по сухому веществу, нитчатая водоросль *Maugeotia* на 11.1% (Кузьмина, 1982). Основными компонентами фитопланктона являются водорастворимые вещества и белки, нитчатых водорослей — углеводы и водорастворимые вещества, зоопланктона и зообентоса — белки и водорастворимые вещества. У представителей бентоса (моллюсков, личинок хирономид, водяных осликов, олигохет и ручейников) содержание углеводов может составлять около половины массы органического вещества. Макрофиты отличаются низким содержанием белков и жиров. Основную массу сухого вещества составляет клетчатка (Кузьмина, 1982, 2005). Содержание сухого вещества у видов, входящих в состав зоопланктона ниже, чем у представителей зообентоса — 4–15% сырого веса.

Однако для рыб из естественных экосистем целесообразнее учитывать сырой, а не сухой вес кормовых объектов (Кузьмина и др., 1979). Пересчет на сырой вес организма показал, что наибольшее количество белка (более 10%) содержится в организме личинок насекомых, в частности личинок стрекоз, моллюсков, принадлежащих к Кл. *Gastropoda*, особенно у прудовика, а также у равноногих (водяной ослик, *Asellus aquaticus*) (табл.1). В 1.5–2 раза меньшая концентрация белка выявлена у олигохет и личинок хирономид. Наибольшее количество углеводов характерно для катушек, меньшее — для олигохет и личинок хирономид. Вместе с тем концентрация указанных веществ в организме беспозвоночных значительно варьирует в зависимости от возраста, сезона и условий среды обитания. Так, у олигохет *Tubifex tubifex* концентрации белка в течение трех месяцев индивидуального развития последовательно уменьшается от 11.8 до 7.2%, а количество углеводов снижается от 1.7 до 0.9%, увеличиваясь через 1 мес. до 2.0% (Кузьмина, 1982).

Таблица 1. Биохимический состав кормовых объектов бентофагов, г/100 г сырой массы (по: Кузьмина, 2008)

Вид	Сухое вещество	Зола	Белки	Липиды	Углеводы
<u>Кл. <i>Gastropoda</i></u>					
<i>Limnaea stagnalis</i>	18.5	1.7	13.5	2.5	0.8
<i>Planorbis planorbis</i>	27.0	7.0	10.6	0.7	8.7
<u>Кл. <i>Bivalvia</i></u>					
<i>Dreissena polymorpha</i> (с раковиной)	43.9	38.7	3.4	0.2	1.6
<i>D. polymorpha</i> (без раковины)	7.5	0.7	3.1	3.4	0.3
<u>Кл. <i>Oligochaeta</i></u>					
<i>Tubifex tubifex</i>	18.1	1.1	8.3	3.6	5.1
<u>Кл. <i>Crustacea</i></u>					
<i>Asellus aquaticus</i>	19.8	7.0	10.2	0.9	1.7
<u>Кл. <i>Insecta</i></u>					
<i>Agrion sp.</i>	16.2	1.6	11.1	1.4	2.1
<i>Lestes sp.</i>	21.3	1.2	14.9	2.8	2.4
<i>Chironomus sp.</i>	11.7	1.5	6.6	0.5	3.1

Большая часть органического вещества в тканях потенциальных объектов питания ихтиофагов представлена белками — 55.6–78% и в меньшей степени жирами — 12.5–20.9% в расчете на сухое вещество (Кузьмина, 1982). Концентрация углеводов в мышцах рыб незначительна — 0.2–0.6% (Кузьмина, Жилина, 1973; Кузьмина и др. 1979). Содержание сухого вещества у рыб — потенциальных объектов питания ихтиофагов, как правило, выше, чем у беспозвоночных. Кормовые объекты ихтиофагов включают от 6.6 (личинки рыб) до 23.0 г/100 г массы (икра рыб), чаще 16–20 г/100 г массы белка (Клейменов, 1962; Маляревская, Биргер, 1965; Шерстюк, 1971). Содержание липидов в тканях рыб разных видов существенно варьируют в диапазоне 4–8 г/100 г массы (Кузьмина и др., 1979).

Также важно отметить значительные изменения содержания энергетических компонентов в тканях рыб не только на разных этапах онтогенеза и в разные периоды их годового цикла (Шульман, 1972; Шатуновский, 1980; Shulman, Love, 1999), но и в короткие промежутки времени, обусловленные циркадианной ритмикой питания (Халько, Халько, 2002). Для процессов пищеварения большое значение имеет степень полимеризации различных компонентов пищи. Белковые компоненты тканей рыб отличаются большими молекулярными массами по сравнению с таковыми беспозвоночных. При этом уровень низкомолекулярных белковых компонентов значительно ниже, чем у беспозвоночных (Кузьмина и др., 1990). Не меньшее значение для процессов пищеварения имеет соотношение различных компонентов пищи, особенно содержания жира, поскольку известно об их влиянии на активность пищеварительных гидролаз (Кузьмина, 1987, Неваленный и др., 2003).

Активность гликозидаз, гидролизующих углеводные компоненты пищи у рыб разных видов. Исследование активности гликозидаз, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у бентофагов Рыбинского водохранилища, показало, что в его Волжском плесе активность α -амилазы, реализующей начальные этапы гидролиза полисахаридов, в слизистой оболочке медиального отдела кишечника у рыб разных видов значительно варьирует (Кузьмина, 1977, 1981). Так, при температуре 20°C минимальный уровень ферментативной активности выявлен у леща и густеры — 3.9 ± 0.2 и 4.0 ± 0.4 мг/г/мин соответственно. Более высокая активность обнаружена у карася и плотвы — 11.1 ± 1.2 и 12.9 ± 1.2 мг/г/мин соответственно. Максимальный уровень активности α -амилазы найден у язя — 20.7 ± 3.2 мг/г/мин. Сведения о спектре питания язя в Рыбинском водохранилище отсутствуют. Однако эти данные могут свидетельствовать о большем количестве полисахаридов в пище язя, чем у других видов рыб.

Особенно важно отметить наличие корреляции между содержанием углеводов и активностью α -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов у рыб разных видов. Действительно, у леща и густеры активность α -амилазы почти в 3 раза ниже, чем у карася и плотвы, в пище которых присутствуют богатые углеводами макрофиты, и в 5 раз ниже, чем у язя. Различия в уровне активности дисахаридаз, обеспечивающих заключительные этапы гидролиза углеводов, у рыб тех же видов значительно ниже. Так, максимальная активность мальтазы у карася лишь в 2 раза выше, чем у плотвы (Кузьмина, 1978, 1981).

Поскольку мальтаза может лимитировать завершение гидролиза полисахаридов, для натуральных наблюдений целесообразно исследовать не активность отдельных гликозидаз, а общую амилолитическую активность (ОАА), включающая активность α -амилазы, γ -амилазы и ферментов группы мальтаз, обеспечивающих различные этапы гидролиза полисахаридов. Определения показали, что наименьший уровень ОАА характерен для леща, больший для плотвы, максимальный для карася: 1.97 ± 0.61 , 7.78 ± 1.16 и 12.00 ± 0.21 мкмоль/г/мин соответственно.

Активность α -амилазы слизистой оболочки медиального отдела кишечника у разных видов ихтиофагов также значительно варьирует (Кузьмина, 1977, 1981). Так, при температуре 20°C минимальный уровень ферментативной активности выявлен у судака — 1.1 ± 0.5 , более высокий у налима и щуки — 1.6 ± 0.5 и 2.1 ± 0.5 , максимальный у окуня — 3.7 ± 1.3 мг/г/мин. Важно отметить, что у ихтиофага-факультативного бентофага окуня активность α -амилазы выше, чем у типичных ихтиофагов. Так, у судака активность α -амилазы в 3.4 раза ниже, чем у окуня. Соотношение уровня ОАА близко такому α -амилазы: у щуки — 0.47 ± 0.09 , у налима — 0.93 ± 0.03 , у окуня — 1.24 ± 0.05 мкмоль/г/мин. Различия в уровне активности дисахаридаз, обеспечивающих заключительные этапы гидролиза углеводов, у рыб тех же видов отсутствуют: максимальная активность сахаразы у щуки и окуня близки 0.12 ± 0.03 и 0.13 ± 0.03 мкмоль/г/мин соответственно (Кузьмина, 1994).

Активность протеиназ у рыб разных видов. При оценке активности ферментов, обеспечивающих гидролиз белковых компонентов пищи у рыб разных видов определялась общая протеолитическая активность (ОПА) — суммарная активность трипсина, химотрипсина и дипептидаз, обеспечивающих различные этапы гидролиза белков, поли-, олиго-, три- и дипептидов. При этом в зависимости от субстрата (казеин или гемоглобин) выявлялась активность преимущественно трипсиноподобных или химотрипсиноподобных протеиназ (Кузьмина, 1990). Полученные данные свидетельствуют о большей активности трипсиноподобных протеиназ по сравнению с химотрипсиноподобными протеиназами как у бентофагов леща, плотвы и карася, так и у исследованного для сравнения планктофага синца (табл. 2).

Таблица 2. Активность трипсиноподобных (верхние цифры) и химотрипсиноподобных (нижние цифры) протеиназ слизистой оболочки кишечника и химуса у разных видов бентофагов в период активного питания

Вид рыбы	Ферментативная активность, мкмоль/г/мин		
	Слизистая оболочка	Химус	Суммарная активность
Лещ	<u>3.80±0.43</u>	<u>6.56±0.54</u>	<u>10.36±0.33</u>
	1.88±0.13	0.34±0.20	2.22±0.15
Плотва	<u>8.36±0.13</u>	<u>3.31±0.11</u>	<u>11.67±0.12</u>
	3.32±0.10	1.42±0.07	4.74±0.08
Синец	<u>4.37±0.19</u>	<u>1.40±0.18</u>	<u>5.77±0.17</u>
	1.02±0.02	0.45±0.02	1.47±0.02
Карась	<u>1.64±0.11</u>	<u>1.74±0.09</u>	<u>3.88±0.09</u>
	0.19±0.03	0.62±0.03	0.81±0.03

Как следует из таблицы, суммарная активность трипсиноподобных протеиназ, функционирующих в полости кишечника и реализующих полостное пищеварение (химус), а также в составе слизистой оболочки кишечника, выше таковой химотрипсиноподобных протеиназ в 4.7, 2.5, 3.9 и 4.2 раза у леща, плотвы, синца и карася соответственно. Также обращает на себя внимание значительно более низкая активность исследованных протеиназ у карася и синца, что может быть обусловлено особенностями спектра питания рыб этих видов. Действительно, в пище карася присутствуют макрофиты, в пище синца доминирует планктон (ветвистоусые, веслоногие, коловратки), но также встречаются макрофиты (Иванова и др., 1978).

Исследование активности трипсиноподобных или химотрипсиноподобных протеиназ у ихтиофагов показало, что во всех случаях активность первых выше, чем вторых (табл. 3).

Таблица 3. Активность трипсиноподобных (верхние цифры) и химотрипсиноподобных протеиназ (нижние цифры) слизистой оболочки кишечника и химуса у разных видов ихтиофагов в период активного питания

Вид рыбы	Ферментативная активность, мкмоль/г/мин		
	Слизистая оболочка	Химус	Суммарная активность
Щука	<u>7.57±0.17</u>	<u>0.36±0.04</u>	<u>7.93±0.12</u>
	2.48±0.09	0.26±0.03	2.74±0.08
Судак	<u>2.23±0.06</u>	<u>0.71±0.04</u>	<u>2.94±0.05</u>
	1.07±0.03	0.40±0.03	1.47±0.03
Окунь	<u>3.56±0.10</u>	<u>0.89±0.09</u>	<u>4.45±0.10</u>
	0.90±0.06	0.72±0.17	1.62±0.11
Налим	<u>4.03±0.15</u>	<u>3.04±0.13</u>	<u>7.07±0.14</u>
	2.46±0.07	2.29±0.21	4.75±0.16

Действительно, суммарная активность трипсиноподобных протеиназ, функционирующих в полости кишечника и реализующих полостное пищеварение (химус), а также в составе слизистой оболочки кишечника, выше таковой химотрипсиноподобных протеиназ в 2.9, 2.0, 2.7 и 1.5 раза у щуки, судака, окуня и налима соответственно. Также обращает на себя внимание значительно более низкая активность исследованных протеиназ у судака и окуня, что может быть обусловлено неравномерностью питания хищных рыб.

Следовательно, несмотря на меньшие видовые различия в уровне активности протеаз по сравнению с гликозидазами, активность ферментов этой цепи также зависит от спектра питания рыб. Эти различия могут быть связаны с тем, что в организме олигохет и хирономид в большем количестве представлены полипептиды с большей молекулярной массой, чем у представителей зоопланктона, в организме которых доминируют аминокислоты и низкомолекулярные пептиды. Так, у представителей зоопланктона 90% растворимых белковых компонентов приходится на фракцию с молекулярной массой 1 кДа. У олигохет на эту фракцию приходится 52%, а на фракцию 500 кДа — 36%. У хирономид 74% растворимого белка имеет молекулярную массу 10–20 кДа (Кузьмина и др., 1990). В тканях моллюсков, в значительно количестве присутствующих в пище плотвы, отмечено большее содержание белка, чем у других видов рыб (Кузьмина и др., 1979).

Динамика активности пищеварительных ферментов на разных этапах онтогенеза рыб. Зависимость активности пищеварительных ферментов от спектра питания рыб проявляется на самых ранних этапах онтогенеза (Ильина, Турецкий, 1987; Кузьмина, Гельман, 1998; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 1996; Кузьмина, 2005). На примере щуки показано, что активность гликозидаз с увеличением возраста рыб снижается (табл. 4). При этом в наибольшей степени уменьшается активность α -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов (в 9.6 раза). Уровень ОАА снижается в 7.1, сахаразы — лишь в 1.3 раза. Активность щелочной фосфатазы у неполовозрелых рыб низка, у взрослых — увеличивается почти в 2 раза.

Особо следует отметить, что у ихтиофага-факультативного бентофага окуня характер изменения активности тех же ферментов по мере взросления рыб отличается от такового типичных ихтиофагов. При этом уровень ОАА изменяется в большей степени, чем активность α -амилазы. Так, ОАА у взрослых рыб ниже, чем у сеголеток в 1.9 раза — 1.30 ± 0.03 и 2.44 ± 0.19 мкмоль/г/мин соответственно, активность α -амилазы — лишь в 1.1 раза (2.18 ± 0.35 и 2.32 мг/г/мин соответственно). Эти данные дают возможность предположить, что большее снижение ОАА по сравнению с активностью α -амилазы обусловлено более резким уменьшением активности дисахаридаз, обеспечивающих заключительные этапы гидролиза полисахаридов. Действительно, активность сахаразы у рыб тех же

возрастных групп снижается в 6.9 раза: 0.13 ± 0.03 и 0.90 ± 0.02 мкмоль/г/мин соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что в пище исследованных окуней в значительном количестве присутствовали беспозвоночные, ткани которых содержат большое количество низкомолекулярных белковых соединений (Кузьмина и др., 1990). По всей вероятности, были исследованы окуни, принадлежащие к литоральной (прибрежной) группе (Поддубный, 1971). При этом активность протеаз у ихтиофагов с возрастом, как правило, увеличивается (Уголев, Кузьмина, 1993). В связи с этим ниже приведены результаты исследования активности гликозидаз и протеаз, обеспечивающих гидролиз углеводных и белковых компонентов пищи и функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника у разных видов ихтиофагов в один и тот же период годового цикла.

Таблица 4. Активность ферментов слизистой оболочки кишечника щуки на разных этапах онтогенеза (по: Кузьмина и др., 1982)

Размер рыб		Ферментативная активность, мкмоль/ г/мин			
Возраст	Масса, г	α -амилаза*	ОАА	Сахараза	Щелочная фосфатаза
1 мес.	1.4 ± 0.07	9.16 ± 0.63	3.30 ± 0.25	0.35 ± 0.02	–
2 мес.	6.3 ± 0.51	5.69 ± 0.51	1.90 ± 0.08	0.40 ± 0.03	0.04 ± 0.002
1+	147.5 ± 3.4	0.98 ± 0.13	0.83 ± 0.09	0.27 ± 0.03	0.05 ± 0.001
> 3+	965.0 ± 193.0	0.95 ± 0.24	0.46 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.09 ± 0.001

Примечание: * – мг/г·мин.

Влияние сезона на активность пищеварительных ферментов. Сезонное изменение температуры воды — один из важнейших экологических факторов, значительно влияющих на активность пищеварительных ферментов. При этом активность ферментов зависит не только от интенсивности их синтеза, но и прямого влияния температуры на состояние активного центра ферментов. Для того, чтобы выявить влияние сезона на интенсивность синтеза ферментов, сопоставляли уровень общей амилитической активности в зимний период при температуре, близкой к 0°C и 20°C . Оказалось, что ОАА при температуре 20°C зимой у леща соответствует 0.73, летом — 1.45, у плотвы 2.0 и 9.98 мкмоль/г/мин соответственно (Kuz'mina et al., 1996). При температуре окружающей среды зимой отмечено резкое снижение ОАА до 0.27 и 0.30 мкмоль/г/мин у леща и плотвы соответственно. При понижении температуры в зимний период от 20 до 0°C ферментативная активность у леща снижается в 2.7 раза, у плотвы — в 6.7 раза. Однако наиболее значительные сезонные изменения уровня ферментативной активности отмечены при исследовании α -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов — 10–15 мг/г/мин в весенний и осенний периоды, а также 60–80 мг/г/мин летом, в период наиболее интенсивного питания (Кузьмина, 1980). У ихтиофагов, питающихся в зимний период, сезонные различия в уровне ОАА ниже. Так, зимой у щуки ОАА соответствует 1.04 ± 0.31 , летом — 1.20 ± 0.24 , сахаразы – 0.04 ± 0.02 и 0.11 ± 0.02 мкмоль/г/мин соответственно (Кузьмина, 1994). Следовательно, сезонная динамика активности ферментов в большей степени зависит от прямого влияния температуры на белковые глобулы ферментов, чем от интенсивности их синтеза.

Поскольку α -амилаза, синтезируемая ацинарными клетками гепатопанкреаса, частично инкретируется в кровь, у 7 видов бентофагов была прослежена сезонная динамика этого показателя (Кузьмина, 1979). При исследовании сезонной динамики активности инкретируемой α -амилазы, при стандартной температуре (20°C) было подтверждено влияние сезона на интенсивность синтеза ферментов у рыб разных видов (табл. 5). Как показывает таблица, в зимний период активность α -амилазы в крови всех исследованных рыб значительно ниже, чем в летний период (у язя, леща и синца в 2–3 раза, у карася, карпа и густеры — в 3.5–4 раза, у плотвы — более, чем в 6 раз). При этом у леща и синца величина показателя снижается в 2.8 раза.

При исследовании сезонной динамики активности инкретируемой α -амилазы у ихтиофагов, было показано, что при температуре 20°C сезон в меньшей степени влияет на интенсивность синтеза ферментов у ихтиофагов, чем у планкто- и бентофагов. Как показывает таблица, летом активность α -амилазы в крови выше, чем зимой только у щуки и судака — в 2.5 и 1.6 раз соответственно. У окуня максимальный уровень ферментативной активности (зимой) превышает минимальный (осенью) в 1.7 раза. При исследовании налима достоверные изменения уровня активности инкретируемой α -амилазы не выявлены. Полученные данные подтвердили, что температурно-зависимые различия сезонной динамики активности α -амилазы выше видовых различий. При этом наблюдаемые различия в

уровне активности α -амилазы крови у ихтиофагов в разные периоды годового цикла значительно ниже, чем у планкто- и бентофагов.

Таблица 5. Сезонная динамика активности α -амилазы в крови у рыб разных экологических групп (по: Кузьмина, 1979)

Вид	Ферментативная активность, мг/мл/мин			
	Зима	Весна	Лето	Осень
Планкто- и бентофаги				
Лещ	0.35±0.03	0.30±0.02	0.98±0.16	0.40±0.05
Плотва	0.23±0.02	0.50±0.11	1.42±0.07	0.74±0.12
Густера	0.44±0.03	0.48±0.08	1.73±0.15	0.59±0.07
Карп	0.36±0.02	0.42±0.04	1.30±0.07	0.58±0.16
Язь	0.61±0.08	0.57±0.07	1.42±0.42	0.60±0.04
Карась	0.23±0.02	0.38±0.03	0.81±0.15	0.06±0.02
Синец	0.25±0.03	0.37±0.03	0.69±0.12	0.37±0.06
Ихтиофаги				
Щука	0.46±0.07	0.66±0.11	1.13±0.32	0.47±0.02
Судак	0.72±0.16	0.86±0.11	1.18±0.14	0.93±0.17
Окунь	1.99±0.11	1.74±0.08	1.49±0.10	1.17±0.18
Налим	0.32±0.02	0.35±0.04	0.30±0.03	0.23±0.08

Следует отметить, что при температуре окружающей среды активность ферментов, функционирующих в кишечнике, варьирует значительно по сравнению с ферментами в крови рыб. Зимой уровень ОАА у щуки снижается до 0.19±0.03, а у налима 0.22±0.05 мкмоль/(г·мин), сахаразы — до 0.25±0.04 и 0.13±0.01 мкмоль/г/мин соответственно. Также важно отметить, что активность α -амилазы в крови ихтиофагов значительно выше, чем у бенто- и планктофагов. Это является зеркальным отражением закономерностей, выявленных при исследовании активности α -амилазы в кишечнике рыб (Уголев, Кузьмина, 1993; Ugolev, Kuz'mina, 1994). Этот феномен наиболее ярко проявляется при расчете коэффициентов отношения активности α -амилазы в крови и слизистой оболочке кишечника рыб (Кузьмина, 2000). Оказалось, что у ихтиофагов эти коэффициенты варьируют от 0.19 у налима до 1.11 у окуня, у бентофагов — от 0.01 у карася до 0.09 у леща. На основании имеющихся данных по объему крови у исследованных видов рыб (Коржув, 1964), а также произведенных на их основании расчетов активности α -амилазы во всем объеме крови, было показано, что у ихтиофагов активность α -амилазы в крови в 3–5 раз ниже, чем у бентофагов, что совпадает с ее активностью в кишечнике (Кузьмина, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993).

Сезонное изменение температуры воды оказывает значительное влияние на активность пищеварительных гидролаз. При этом важно отметить, что на активность ферментов влияют не только различия в интенсивности их синтеза, но и прямое влияние температуры на состояние активного центра ферментов. Для того, чтобы выявить влияние сезона на интенсивность синтеза ферментов, сопоставляли уровень общей амилалитической активности в зимний период при температуре, близкой к 0°C и 20°C. Оказалось, что ОАА при температуре 20°C зимой у леща соответствует 0.73, летом — 1.45, у плотвы 2.0 и 9.98 мкмоль/г/мин соответственно (Kuz'mina et al., 1996). При температуре окружающей среды зимой отмечено резкое снижение ОАА до 0.27 и 0.30 мкмоль/г/мин у леща и плотвы соответственно. При понижении температуры в зимний период от 20 до 0°C ферментативная активность у леща снижается в 2.7 раза, у плотвы — в 6.7 раза. Однако наиболее значительные сезонные изменения уровня ферментативной активности отмечены при исследовании α -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов (Кузьмина, 1980). Следовательно, сезонная динамика активности ферментов в большей степени зависит от прямого влияния температуры на белковые глобулы ферментов, чем от интенсивности их синтеза.

Активность ферментов потенциальных объектов питания рыб, участвующих в гидролизе углеводов и белков собственных тканей. При исследовании потенциальных объектов питания ихтиофагов, обитающих в Рыбинском водохранилище, было установлено, что активность гликозидаз у

них крайне низка. В ряде случаев она сопоставима с таковой кишечника рыб. Так, уровень ОАА, рассчитанный стандартным способом, при 20°C (рН 7.4) минимален в пробах рачкового планктона, в котором доминируют особи *Diatomus sp.* (1.2±0.1 мкмоль/г/мин), максимален у прудовика (7.8±0.8 мкмоль/г/мин). У представителей зоопланктона, в котором доминируют особи *Bosmina longispina* или *Polyphaemus pediculus*, ОАА в 2–3 раза выше. У личинок хирономид *Chironomus plumosus* и олигохет *Tubifex tubifex* ОАА еще выше — 4–5 мкмоль/г/мин. При этом ОАА у массовых видов бентических форм сопоставима с таковой слизистой оболочки кишечника рыб–бентофагов. Уровень ОПА по казеину (рН 7.4), напротив, у них значительно ниже, чем у представителей зоопланктона: менее 0.2 и более 0.3 мкмоль/г/мин соответственно.

Уровень ОПА по гемоглобину (рН 3.0), характеризующий активность катепсинов, у всех исследованных гидробионтов значительно выше ОАА и в ряде случаев сопоставим с таковым мембранных протеиназ. Так, активность протеиназ всех тканей живородки *Viviparus viviparus* соответствует 1.53±0.09, перловицы *Unio pictorum* — 2.31±0.26, представителей зоопланктона 1.49±0.11 мкмоль/г·мин. Активность протеиназ в мышцах карасей несколько ниже, особенно у обыкновенного карася (0.94±0.05 и 1.24±0.05 мкмоль/г·мин), чем у беспозвоночных. Однако, данные, касающиеся висцеральных органов и икры серебряного карася исключительно близки таковым моллюсков и зоопланктона — 1.49±0.01 и 1.44±0.09 мкмоль/г·мин соответственно. С учетом массы тела активность протеиназ во всех тканях одной особи в случае живородки соответствует 3.1, перловицы — 23.9 мкмоль/мин. Поскольку масса мышц составляет лишь 10–15%, а масса висцеральных органов и икры — 20 и 25% от общей массы рыб без головы, тотальную активность протеиназ можно рассчитать лишь приблизительно. Оказывается, что у серебряного карася активность протеиназ мягких тканей тушки без головы равна 40.3 мкмоль/мин. Поскольку масса живородок минимальна (4.8 г), а карася — максимальна (64.9 г), эти данные свидетельствуют о том, что вклад ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб зависит, главным образом, от их массы. При этом активность и тех, и других протеиназ варьирует в зависимости от рН среды (табл. 6).

Таблица 6. Активность казеинлитических и гемоглобинлитических протеиназ в целом организме потенциальных объектов питания ихтиофагов при разных значениях рН (по: Kuz'mina, Ushakova, 2010)

рН	Активность протеиназ, мкмоль/г/мин			
	Тюлька	Ерш	Окунь	Плотва
	Субстрат казеин			
5.0	0.50±0.04	0.80±0.06	2.20±0.06	0.48±0.05
7.4	0.37±0.04	0.92±0.06	1.39±0.07	1.01±0.03
8.5	0.65±0.03	1.13±0.05	1.22±0.07	1.28±0.06
	Субстрат гемоглобин			
3.0	2.87±0.11	1.34±0.06	9.64±0.11	0.77±0.03
5.0	2.39±0.04	0.98±0.06	4.17±0.10	0.60±0.05
7.4	1.48±0.05	1.07±0.05	2.35±0.08	0.89±0.03
8.5	2.00±0.09	1.37±0.03	2.57±0.04	1.40±0.03

Как показывает таблица, наиболее высокий уровень казеинлитической активности выявлен у окуня при рН 5.0, что соответствует активности катепсина В. У остальных исследованных видов наиболее высокий уровень ферментативной активности наблюдается в зоне щелочных значений рН. При рН 5.0 функционируют катепсины различных тканей рыб, при рН 7.4 и 8.5 — нейтральные и сериновые протеиназы их пищеварительной системы. Следовательно, в процессах аутодеградации белковых компонентов тканей объектов питания ихтиофагов могут участвовать все имеющиеся в организме рыб протеиназы. При этом значительную роль играет соотношение массы жертвы и уровня активности протеиназ в ее тканях (табл. 7). С увеличением массы (возраста) активность протеиназ снижается, в наибольшей степени гемоглобинлитических протеиназ. Тотальная активность протеиназ изменяется разнонаправленно: тотальная активность гемоглобинлитических протеиназ снижается, в то время как активность тотальная активность казеинлитических протеиназ увеличивается.

Индукцированный аутолиз. Как было указано выше, существенная роль в реализации начальных этапов расщепления пищи может принадлежать механизму индуцированного аутолиза. При этом в кислой среде желудка рыб, а также в результате закисления тканей жертвы, наблюдающегося при усилении в бескислородной среде гликолиза, в ее тканях накапливаются ионы водорода, которые активируют внутриклеточные, преимущественно лизосомальные, гидролазы.

Таблица 7. Размерно-массовые характеристики и активность протеиназ в организме молоди щук (по: Кузьмина и др., 2013).

Дата	Размер рыб, см	Масса рыб, г	Активность протеиназ			
			Казеинлитическая		Гемоглобинлитическая	
			1	2	1	2
5.07	10.7±0.3	7.3±0.5	1.27±0.38	9.27±1.45*	3.10±0.46	22.63±2.97*
9.07	10.8±5.7	11.3±1.4	1.00±0.12	11.30±1.24*	1.76±0.22	19.88±4.40*

Примечание. В скобках указано количество исследованных рыб: 1 — мкмоль/г/мин, 2 – мкмоль/мин. * — различия достоверны между 1 и 2 ($p=0.05$).

Эти ферменты реализуют самопереваривание жертвы. Участие индуцированного аутолиза в процессах пищеварения у ихтиофагов было продемонстрировано на примере щуки и судака (Кузьмина, 2000; Кузьмина, Скворцова, 2003). При этом было доказано, что ферменты жертвы вносят значительный вклад в процессы пищеварения консументов. При сравнении тотальной активности протеиназ и гликозидаз в слизистой оболочке кишечника рыб, а также в целом организме жертв, было показано, что на начальных этапах пищеварения активность протеиназ жертв может в 5–10 раз, а гликозидаз — в сотни раз превышать таковую слизистой оболочки желудка консументов (Кузьмина, 2000; Кузьмина, Скворцова, 2003; Kuz'mina, Golovanova, 2004).

Также важно отметить, что в течение длительного пребывания объектов питания рыб в кислой среде в отсутствие экзогенных субстратов активность ферментов значительно увеличивается. Динамика этого процесса зависит от таксономии жертв и специфики ткани (Кузьмина, 1993; Kuz'mina, 2008). При этом наименьший уровень активности протеиназ характерен для мышц, наибольший — для кишечника. Однако степень увеличения ферментативной активности при длительной экспозиции тканей в условиях кислой среды в кишечнике значительно меньше, чем в гепатопанкреасе и мышцах рыб.

Симбионтное пищеварение. В последние годы значительное внимание уделяется микрофлоре кишечника рыб. Наиболее важным для понимания роли симбионтного пищеварения в процессах пищеварения у рыб было выявление таких экстрацеллюлярных ферментов, как карбогидразы и протеиназы (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Cahill, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Buddington et al., 2000; Кузьмина, 2005; Bakke et al., 2010; Ganguly, Prosad, 2012; Ray et al., 2012). Бактериальная флора пищеварительного тракта в значительной мере зависит от характера питания рыб. В частности, для ихтиофагов характерно меньшее количество амилотических бактерий, чем у планкто- и бентофагов (Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005). Поскольку в тканях потенциальных объектов питания ихтиофагов преобладают белковые компоненты, наибольший интерес представляет изучение характеристик протеиназ. Как указывалось выше, активность ферментов кишечной микрофлоры определяется после ее выделения и культивирования (наращивания массы), поэтому корректно оценить ее вклад в процессы пищеварения невозможно. Вместе с тем о роли ферментов энтеральной микробиоты можно судить, используя сопоставление их характеристик с таковыми ферментов, функционирующих в составе химуса и слизистой оболочки кишечника. При этом наиболее важно сопоставление рН- и температурной зависимости ферментов.

Влияние рН на активность трипсиноподобных протеиназ и гликозидаз химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты. При исследовании ферментативного аппарата пищеварительного тракта рыб в абсолютном большинстве работ изучаются характеристики ферментов слизистой оболочки кишечника (Кузьмина, 1978, 2005). Ниже приведены данные, касающиеся активности протеиназ слизистой оболочки кишечника у ряда массовых видов ихтиофагов. Обращают на себя внимание большая зависимость от рН среды трипсиноподобных протеиназ по сравнению с химотрипсиноподобными протеиназами, а также видовые различия в уровне ферментативной активности (табл. 8).

Вместе с тем ферменты химуса и энтеральной микробиоты могут значительно отличаться от таковых слизистой, поскольку в химусе присутствуют ферменты объектов питания рыб и кишечной микрофлоры. При этом одинаковые по функции, но различные по происхождению и структуре протеиназы и гликозидазы объектов питания рыб и кишечной микрофлоры имеют характеристики, в частности оптимумы рН, отличающиеся от таковых слизистой оболочки кишечника рыб. Действительно, при изучении влияния рН на активность протеиназ у рыб из Рыбинского водохранилища были выявлены значительные различия характеристик ферментов слизистой, химуса и энтеральной микробиоты (Kuz'mina et al., 2011).

Таблица 8. Активность протеиназ, функционирующих в составе слизистой оболочки кишечника ихтиофагов, при разных значениях pH (по: Kuz'mina, Ushakova, 2010).

pH	Активность протеиназ, мкмоль/г/мин			
	Щука	Судак	Окунь	Налим
	Субстрат казеин			
7.4	11.12±0.23	2.75±0.08	6.19±0.13	5.77±0.11
8.5	13.15±0.25	4.71±0.08	6.53±0.08	7.26±0.10
	Субстрат гемоглобин			
7.4	4.45±0.07	1.73±0.03	1.43±0.03	3.84±0.06
8.5	4.86±0.14	1.99±0.03	1.78±0.10	4.52±0.07

У исследованных видов рыб минимальные значения протеолитической активности слизистой оболочки кишечника всегда наблюдаются при pH 5.0, максимальные — при pH 10.0, максимум активности протеиназ химуса может варьировать в пределах pH 8.0–10.0 (рис. 1). Однако оптимум pH кишечной микрофлоры у рыб разных видов находится при разных значениях pH: у плотвы — при 5.0, у леща — при 8.0. При этом у леща совпадает величина оптимума pH протеолитической активности микрофлоры и химуса (8.0). При pH 5.0 у плотвы выявляется 100, у леща — 72% от максимальных значений соответственно.

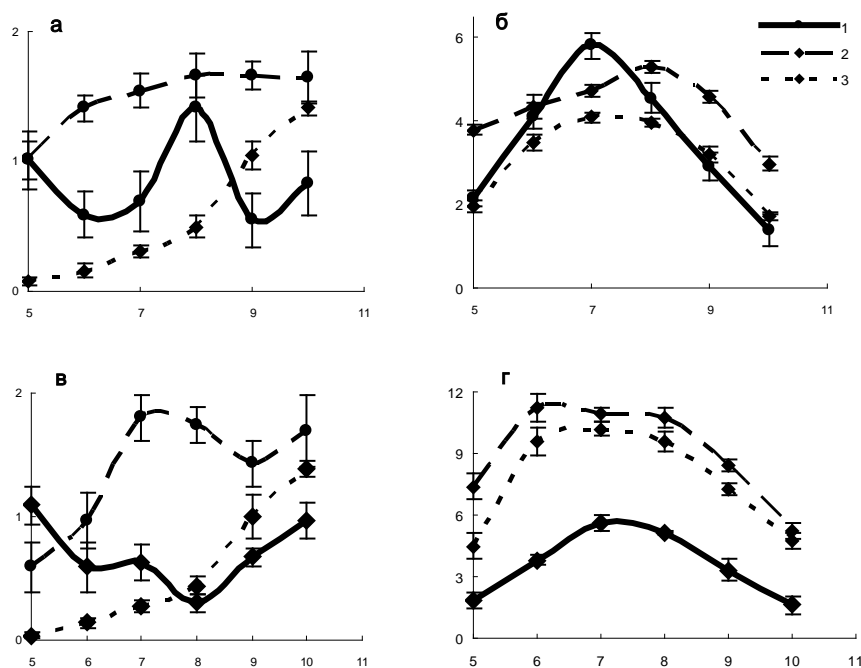


Рис. 1. Влияние pH на активность трипсиноподобных протеиназ (а, в) и гликозидаз (б, г) химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (- -●- -) и энтеральной микрофлоры (—■—) у леща (а, б) и плотвы (в, г) (по: Kuz'mina et al., 2011). Обозначения. По оси абсцисс – значения pH, по оси ординат – активность протеиназ, % максимальной, принятой за 100.

В отличие от протеиназ, оптимум pH гликозидаз, синтезируемых пищеварительной системой рыб, их объектов питания и энтеральной микрофлорой существенно не различается. При этом у ихтиофагов, как и у бентофагов, оптимум pH не только общей амилолитической активности, но также активности α -амилазы и мальтазы отмечен в зоне pH 7.0–8.0 (Кузьмина, Неваленный, 1983; Kuz'mina et al., 2011). Лишь оптимум pH действия сахаразы слизистой оболочки кишечника у некоторых видов рыб отмечен при pH 6.0 (Кузьмина, Неваленный, 1983).

Влияние температуры на активность протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микрофлоры. Температура в меньшей степени влияет на характеристики пищеварительных гидролаз ихтиофагов по сравнению с таковыми планкто- и бентофагов (Уголев, Кузьмина, 1993; Gelman et al., 2008). Наибольшие различия были выявлены при исследовании влияния температуры на активность ферментов, гидролизующих углеводные компоненты пищи.

Показано, что температурный оптимум α -амилазы, обеспечивающей начальные этапы гидролиза полисахаридов, у ихтиофагов находится при более низкой температуре (30°C), чем у планкто- и бентофагов (40°C). При этом относительная активность α -амилазы в зоне низких температур у первых варьирует от 50 до 70%, у вторых не превышает 15% максимальной активности. Также значительно различаются величина энергии активации α -амилазы в зоне низких температур — у ихтиофагов 2.6–4.7, у планкто- и бентофагов — 8.8–11.5 ккал/моль. Следовательно, эффективность процесса гидролиза полисахаридов у ихтиофагов в среднем в 2 раза выше, чем у рыб других экологических групп (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). Характеристики протеиназ, синтезируемых в ацинарных клетках гастропанкреаса и функционирующих в кишечнике рыб, близкие таковым гликозидаз планкто- и бентофагов не эффективны в зимний период. Вместе с тем пепсиноподобные протеиназы слизистой оболочки желудка рыб разных видов хорошо адаптированы к низким температурам — относительная активность в зоне 0 – 10°C составляет 70–80% максимальной активности, величина энергии активации — 2.2–2.6 ккал/моль (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993). При исследовании температурной зависимости протеиназ слизистой оболочки кишечника, химуса и энтеральной микробиоты были выявлены существенные отличия формы их кривых у рыб разных видов (рис. 2).

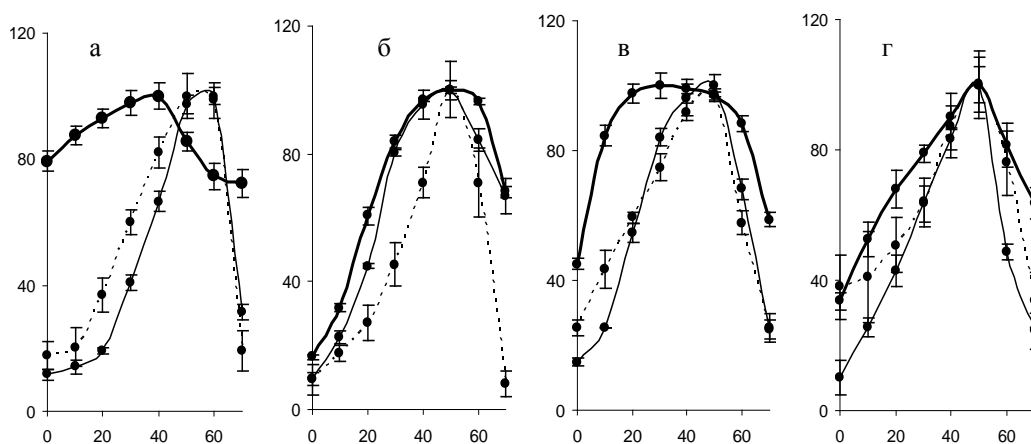


Рис. 2. Влияние температуры на активность трипсиноподобных протеиназ химуса (—●—), слизистой оболочки кишечника (---●---) и энтеральной микробиоты (- -●- -) у щуки (а), судака (б), налима (в) и окуня (г) (по: Кузьмина и др., 2012). Обозначения: по оси абсцисс — температура $^{\circ}\text{C}$; по оси ординат — относительная активность, % максимальной, принятой за 100%.

Действительно, активность протеиназ химуса у всех видов рыб в диапазоне температур 0 – 30°C выше таковой слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты. Значения активности протеиназ химуса, достоверно не отличающиеся от величины температурного оптимума, зимой у щуки и налима обнаружены в диапазоне температур 30 – 40°C и 20 – 40°C , летом у судака — 40 – 60°C . Лишь у окуня (лето) величина температурного оптимума соответствует 50°C . Максимальная активность протеиназ слизистой оболочки кишечника у щуки и судака отмечена в диапазоне температур 50 – 60°C , у налима и окуня — при 50°C . При этом активность протеиназ энтеральной микробиоты, достоверно не отличающаяся от температурного оптимума, у щуки находится в диапазоне температур 50 – 60°C , у судака, налима и окуня соответствует 50°C . Также важно отметить, что относительная активность ферментов энтеральной микробиоты при 0°C всегда выше таковой слизистой оболочки кишечника. Наиболее высокая относительная активность трипсиноподобных протеиназ при 0°C выявлена для ферментов химуса щуки и налима — 80% и 45% соответственно, а также энтеральной микробиоты у окуня — 38% максимальной активности.

Форма кривых t° -зависимости химотрипсиноподобных протеиназ химуса, слизистой оболочки кишечника и энтеральной микробиоты у ихтиофагов одного вида близка. Температурный оптимум химотрипсиноподобных протеиназ всех препаратов у большинства видов рыб равен 50°C . В большинстве случаев активность химотрипсиноподобных протеиназ химуса выше таковой слизистой оболочки кишечника. Относительная активность химотрипсиноподобных протеиназ при 0°C почти всегда ниже таковой трипсиноподобных протеиназ. Наиболее высокая относительная активность протеиназ среди указанных выше видов рыб выявлена при исследовании ферментов химуса щуки (23.5%). Важно отметить, что относительная активность протеиназ химуса у окуня из пелагической

группы близка таковой щуки (23.7%), в то время как у окуня из литоральной группы — значительно выше (33.3%) максимальной активности.

Влияние температуры на активность ферментов объектов питания рыб. При исследовании температурной зависимости ОАА и ОПА, функционирующих в целом организме объектов планкто- и бентофагов при низких значениях рН, были выявлены как существенные видовые различия формы кривой температурной зависимости, так и различия, обусловленные структурой субстрата (Кузьмина, 1999). Позднее было показано, что при рН 3.0 (субстрат гемоглобин) температурный оптимум ферментов моллюсков и обыкновенного карася находится при 60°C, рачкового планктона и серебряного карася — 50°C. Относительная активность протеиназ при 0°C у перловицы и обыкновенного карася составляет около 10%, у рачкового планктона и серебряного карася — около 20, у живородки — 30% от максимальной активности (Кузьмина и др., 2014). Температурный оптимум протеиназ тканей объектов питания рыб-ихтиофагов по казеину (рН 5.0) у стерляди, тюльки и окуня находится в зоне 50°C, у молоди карповых — 60°C. Относительная активность протеиназ при 0°C крайне низка — 2.6–8.3% максимальной активности. Температурный оптимум протеиназ по гемоглобину (рН 3.0) у тюльки и окуня выявлен в зоне 40°C, у молоди карповых — при 50°C, у стерляди — при 60°C. Относительная активность протеиназ при 0°C у стерляди составляет 16.4%, у окуня — 20.1, у тюльки — 25.8% у молоди карповых — 37.3% максимальной активности (Кузьмина и др., 2015).

Данные, касающиеся $E_{\text{акт}}$ протеиназ, функционирующих в составе тканей исследованных видов, свидетельствуют как о некоторых видовых различиях показателя, так и о его зависимости от температуры и субстрата. В большинстве случаев величины $E_{\text{акт}}$ казеинлитических протеиназ выше таковых гемоглобинлитических протеиназ. Так, в зоне низких температур (0–10°C) величины $E_{\text{акт}}$ казеинлитических протеиназ варьируют от 5.3 (тюлька) до 19.8 (карповые), гемоглобинлитических протеиназ — от 2.5 (карповые) до 7.4 (тюлька) ккал/моль. У окуня величина $E_{\text{акт}}$ составляет 2.7 ккал/моль. Значение $E_{\text{акт}}$ протеиназ мышечной ткани у обыкновенного карася в зоне 0–20°C (12.1 ккал/моль) в 1.7 раза, у серебряного карася — (5.9 ккал/моль) в 1.2 раза выше, чем в зоне 20–30°C (Кузьмина и др., 2015). При этом во всем диапазоне жизнедеятельности серебряного карася величина $E_{\text{акт}}$ пептидаз значительно ниже, чем у обыкновенного карася. Особо следует отметить исключительно низкие величины показателя в зоне 0–10°C, выявленные при исследовании висцеральных органов и икры (1.4 и 1.8 ккал/моль). У живородки в зоне низких температур величина $E_{\text{акт}}$ протеиназ почти в два раза выше, чем в зоне более высоких температур (10–30°C), у перловицы, напротив, почти в два раза ниже. Аналогичная закономерность выявлена и при исследовании рачкового планктона: величина показателя в зоне низких температур в 2.2 раза ниже по сравнению с таковой в зоне более высоких температур (Кузьмина и др., 2014). Наиболее низкие значения этого параметра, выявленные при исследовании гемоглобинлитических протеиназ тканей окуня и рыб сем карповых, а также висцеральных органов и икры у серебряного карася, указывают на их большую адаптированность к функционированию при низких температурах.

Межгодовая вариабельность активности пищеварительных гидролаз. Помимо видовых различий в спектре питания и сезонных изменений ферментативной активности, обусловленных изменением температуры, существенное влияние на активность одноименных ферментов оказывает интенсивность питания рыб, которое в большой степени зависит как от состояния кормовой базы, так и доступности потенциальных жертв (Fänge, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003; Кузьмина, 2005). В свою очередь состояние кормовой базы и доступность потенциальных жертв зависит от физико-химических параметров среды, в том числе температуры, кислородного режима, рН и других факторов. При сопоставлении активности одноименных ферментов у рыб разных видов, значительно различающихся по характеру питания, было показано, что в период интенсивного питания рыб активность гидролаз максимальна, а коэффициент вариации показателя минимален (Уголев, Кузьмина, 1993). Однако межгодовая изменчивость активности пищеварительных гидролаз ранее практически не исследовалась (Кузьмина, 1994). Вместе с тем эти сведения крайне важны для оценки условий питания массовых видов рыб. В связи с этим нами проанализировано подекадное изменение активности ряда пищеварительных ферментов у леща и плотвы, обитающих в Волжском плесе, на протяжении последних 40 лет.

Активность пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника леща. Результаты многолетнего исследования активности пищеварительных ферментов у леща показывают, что на протяжении 20 лет наблюдения уровень ОПА и ОАА значительно увеличился (табл. 9). Резкое увеличение этих показателей в 90-е годы обусловлено тем, что ранее исследовалась активность ферментов, реализующих мембранное пищеварение, когда удалялся слой слизистых наложений, а в последующие годы — все ферменты, связанные со слизистой оболочкой. Если учесть, что слизистые наложения содержат пищеварительные ферменты, особенно синтезируемые гепатопанкреасом, то становится

ся ясным, что общая активность ферментов, локализованных на мембранах энтероцитов, в гликокаликсе и слизистых наложениях, должна быть значительно выше (в 1.5–2 раза). С учетом этого замечания становится понятным, что уровень ОПА сопоставим, а уровень ОАА лишь несколько ниже таковых в 90-е годы. Особо следует отметить увеличение обоих показателей в последние годы. По всей вероятности, это связано с резким уменьшением возраста отлавливаемых рыб. Активность сахаразы, связанной с мембранами энтероцитов, в 80-е годы увеличилась, Изменение активности ферментов группы мальтаз носило колебательный характер. В зимний период в 70–80-е годы уровень ОПА составлял 0.16 ± 0.04 , ОАА — 0.19 ± 0.03 , сахаразы — 0.06 ± 0.02 , мальтазы — 20 ± 0.04 мкмоль/г·мин. При этом низкий уровень и низкая вариабельность ферментативной активности были характерны для всего первого двадцатилетнего периода наблюдений.

Таблица 9. Активность пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника леща в летний период (по: Кузьмина, Соломатин, 2014)

Годы	Размер рыб		Ферментативная активность, мкмоль/ г·мин			
	Длина, см	Масса, г	ОПА	ОАА	Сахаразы	Мальтаза
1970-1979	364±2	815±36	2.57±0.13	2.13±0.13	0.32±0.07	2.04±0.29
1980-1989	342±5	837±32	2.90±0.50	2.40±0.12	0.57±0.08	2.23±0.41
1990-1999	339±3	809±20	4.40±0.40	6.74±0.20	0.96±0.09	2.66±0.22
2000-2012	275±4	425±20	8.64±0.46	8.78±1.65	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 10 жирным шрифтом выделены достоверные различия при сравнении с предыдущим десятилетием при $p \leq 0.05$.

Активность пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника плотвы. Многолетнее исследование активности пищеварительных ферментов у плотвы подтвердило, что за последние 20 лет наблюдения уровень ОПА и ОАА, как и у леща, значительно увеличивается (табл. 10).

Таблица 10. Активность ферментов слизистой оболочки кишечника плотвы в летний период (по: Кузьмина, Соломатин, 2014)

Годы	Размер рыб		Ферментативная активность, мкмоль/ г·мин			
	Длина, см	Масса, г	ОПА	ОАА	Сахаразы	Мальтаза
1970-1979	269±3	480±19	1.57±0.26	1.68±0.12	1.53±0.14	2.38±0.42
1980-1989	276±5	475±28	1.88±0.13	1.36±0.31	1.67±0.19	2.04±0.29
1990-1999	157±2	88±4	5.40±0.60	5.35±0.69	1.63±0.24	2.90±0.12
2000-2012	237±4	305±15	13.52±1.87	10.19±0.25	-	-

При этом в течение первых 20-ти лет уровень ОПА и ОАА был ниже, чем у леща. Значительное увеличение ОПА по указанной выше причине наблюдалось в 90-е годы. При учете всех ферментов, связанных со слизистой, их активность должна быть в 1.5–2 раза выше. При этом даже при двукратном увеличении уровня ОПА и ОАА величины показателя оказываются ниже таковых в 90-е и более поздние годы. Это явление может быть связано как с уменьшением возраста отлавливаемых рыб, так и с улучшением условий питания в последние десятилетия, в частности снижением уровня антропогенной нагрузки.

Активность дисахаридаз за 30 лет наблюдения практически не изменялась. При этом активность сахаразы была значительно выше, чем у леща, что может быть обусловлено наличием в пище макрофитов. В зимний период в 70–80-е годы уровень ОПА составлял 0.19 ± 0.03 , ОАА — 0.36 ± 0.04 , сахаразы — 0.27 ± 0.08 , мальтазы — 0.44 ± 0.02 мкмоль/г·мин. При этом, как и в случае леща, низкий уровень и низкая вариабельность ферментативной активности была характерна для всего периода наблюдений. Подобная закономерность была отмечена ранее при анализе вариабельности активности мембранных ферментов (Кузьмина, 1994).

Нетрудно заметить, что данные по динамике уровня активности ОПА и ОАА слизистой оболочки кишечника леща, а в последнее десятилетие — и плотвы, находятся в обратной зависимости от

показателей уловов. Так, данные по уловам учетного трала свидетельствуют о последовательном снижении улова леща (160, 170, 100 и 90 экз./ч траления) и некотором увеличении улова плотвы — 12, 13, 24 и 18 экз./ч траления (Герасимов и др., 2013). Поскольку данные по уловам учетного трала можно рассматривать, как показатель численности рыб, для обоих видов рыб отмечено некоторое ее повышение в 80-е годы. Численность леща в последующие годы значительно снижалась, плотвы — повышалась, особенно в 90-е годы. Противоположный характер динамики уловов учетного трала и активности пищеварительных ферментов у леща и неполное соответствие этих показателей у плотвы может быть обусловлено несколькими причинами.

Увеличение уровня ОПА и ОАА в первую очередь связано с тем, что в первые два десятилетия исследовалась активность ферментов, реализующих мембранное пищеварение, когда удалялся слой слизистых наложений (Уголев, Кузьмина, 1993), а в последующие годы — активность ферментов, включающих слизистые наложения. Если учесть то, что слизистые наложения содержат ферменты, синтезируемые гепатопанкреасом (α -амилазу, трипсин и химотрипсин) и обеспечивающие начальные этапы гидролиза полисахаридов и белков, то становится ясным, что суммарная активность ферментов, локализованных на мембранах энтероцитов, структурах гликокаликса и в слизистых наложениях, должна быть значительно выше (Kuz'mina, Ushakova, 2013). Сопоставление ОПА и ОАА препаратов слизистой оболочки, содержащих и не содержащих слизистые наложения, показали, что в первом случае активность ферментов в 1.5–2 раза выше. С учетом этого замечания становится понятным, что уровень ОПА в первые годы наблюдения сопоставим с таковым в 90-е годы, а различия в уровне ОАА меньше значений, указанных в таблице. Однако даже при двукратном увеличении уровня ОПА и ОАА величины показателя оказываются ниже таковых в 90-е и более поздние годы.

Особо следует отметить резкое увеличение обоих показателей в последнее десятилетие. Как известно, до зарегулирования верхней Волги в уловах доминировали лещ и плотва (Кулемин, 1944). После заполнения Рыбинского водохранилища на фоне увеличения общей биомассы рыб в 3–4 раза изменилось соотношение доминирующих видов. Начиная с 1945 г., в промысловых уловах доминирует плотва, а уловы леща уступают таковым синца, щуки и судака. Увеличение численности рыб в 80-е годы связывается с повышением трофического уровня в результате антропогенного эвтрофирования, а ее снижение в 90-е и последующие годы — с увеличением промысловой нагрузки. При этом наблюдалось последовательное снижение в уловах рыб старших возрастных групп и увеличение доли меньших по размеру неполовозрелых особей (Герасимов и др., 2013), что подтверждают наши данные. Следовательно, увеличение активности ферментов связано не только с увеличением уловов, способствующим уменьшению нагрузки на кормовую базу рыб, особенно на численность и биомассу бентоса, но и с большей активностью пищеварительных гидролаз у рыб младших возрастных групп (Kuz'mina, 1996).

Большая активность сахаразы в слизистой оболочке кишечника плотвы по сравнению с таковой леща на всем протяжении наблюдений, а также большинства ферментов в последние годы, связана с особенностями спектров питания рыб этих видов. Более высокий уровень активности сахаразы слизистой оболочки кишечника у плотвы может быть обусловлен значительным количеством присутствующих в пище рыб этого вида богатых углеводами макрофитов (Иванова и др., 1978; Poddubnyi, Galat, 1995), протеиназ, возросшей ролью в питании плотвы моллюсков, в частности дрейссены (Poddubnyi, Galat, 1995). Несмотря на отсутствие периодически отмечаемой разными авторами строгой корреляции между активностью пищеварительных ферментов и пищевой специализацией рыб (Chakrabarti et al., 1995; Krogdahl et al., 2005; Papoutsoglou, Lyndon, 2006), в большинстве работ у растительноядных видов отмечался высокий уровень активности гликозидаз (Fänge, Grove, 1979; Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, 2005). При исследовании рыб Рыбинского водохранилища было показано, что не только у типичных и факультативных ихтиофагов, но у бентофага плотвы активность протеиназ достаточно близка к таковым у типичных ихтиофагов (Kuz'mina, Ushakova, 2010; 2013). Снижение активности щелочной фосфатазы, по всей вероятности, вызвано отсутствием в уловах рыб старших возрастных групп и меньшей миграционной активностью рыб младших возрастных групп.

Итак, на протяжении последних 40 лет наблюдается устойчивая тенденция увеличения активности большинства пищеварительных ферментов в слизистой оболочке кишечника леща и плотвы. Наблюдаемое явление в значительной мере обусловлено уменьшением нагрузки на кормовую базу рыб, особенно на численность и биомассу бентоса, а также большей активностью пищеварительных гидролаз у рыб младших возрастных групп. Большая активность сахаразы в слизистой оболочке кишечника у плотвы в период 2000–2012 гг. по сравнению с таковой у леща, по всей вероятности, связана с более высоким содержанием в ее пище богатых углеводами макрофитов, а протеиназ — возросшей ролью моллюсков в питании рыб этого вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, устойчивость водных экосистем в значительной мере зависит от эффективности трофических взаимоотношений гидробионтов. Это обстоятельство в значительной мере обуславливает интерес к изучению закономерностей процессов пищеварения у рыб, которые существенно изменились в последние годы. Поскольку синэкологические связи рыб в значительной степени базируются на эффективности их трофических взаимоотношений (Поддубный, 1971; Begon et al., 1990; Розенберг и др., 2000), важно отметить, что данные, полученные при исследовании рыб Рыбинского водохранилища, существенно дополняют сведения о молекулярных механизмах отношений консументов и их потенциальных жертв. При этом эффективность трофических взаимоотношений, связанных с переносом вещества с одного трофического уровня на другой зависит не только от особенностей функционирования ферментных систем трофических партнеров, но и энтеральной микробиоты. Адаптивные изменения характеристик пищеварительных ферментов у рыб разных экологических групп были обнаружены как при изучении мембранных гликозидаз кишечника (Кузьмина, 1985; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, Gelman, 1997; Кузьмина, 2005; Голованова, 2006), так и протеиназ слизистой оболочки желудка и кишечника (Кузьмина, 1990; Уголев, Кузьмина, 1993; Kuz'mina, Golovanova, 2004).

Изучение активности и температурных характеристик протеиназ, функционирующих в составе химуса у рыб разных экологических групп подтвердило ранее высказанную гипотезу о том, что отсутствие адаптивных изменений протеиназ, синтезируемых пищеварительной системой рыб, компенсируется ферментами энтеральной микробиоты и объектов питания рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Действительно, на ранних этапах исследования температурных характеристик адаптации к низкой температуре ферментов, входящих в цепь протеаз, отмечались только для пепсиноподобных протеиназ желудка ихтиофагов, питающихся при низкой температуре. При этом их относительная активность в диапазоне 0–20°C составляла 70–80% максимальной активности. Характеристики трипсиноподобных протеиназ не зависели от типа питания рыб, и их относительная активность у рыб разных экологических групп в зоне низких температур составляла лишь 5–15% максимальной активности (Кузьмина, 1990). Вместе с тем протеиназы, функционирующие в кишечнике, обеспечивают не только процессы экотрофии, но и эндотрофии, протекающие на протяжении всего годового цикла рыб, в том числе и в зимний период (Кузьмина, 2005). Последнее и дало возможность предположить возможность адаптивного изменения характеристик протеиназ энтеральной микробиоты и объектов питания рыб разных экологических групп, позволяющую пищеварительной системе эффективно функционировать при низкой температуре, что и было доказано в последние годы. В соответствии с предложенной нами классификацией физиологических адаптаций (Кузьмина, 2001; Кузьмина, 2005), адаптивные изменения характеристик ферментов симбионтов и потенциальных объектов питания рыб относятся к категории надорганизменных адаптаций.

Однако далеко не во всех случаях выявлена зависимость уровня активности протеиназ от типа питания рыб, что, по всей вероятности, связано со значительной пластичностью ферментных систем у бентофагов, отличающихся широким спектром питания, а также с неравномерностью питания ихтиофагов (Иванова и др., 1978). Поскольку основным механизмом реализации нутритивных адаптаций гидролаз консументов является изменение количества синтезируемых ферментов в границах эволюционно закрепленной адаптивной нормы реакции, особую роль играет субстратная регуляция, способствующая быстрой перестройке ферментных систем в ответ на изменение концентрации отдельных нутриентов (Уголев, 1972). Кроме того, адаптивные перестройки могут осуществляться благодаря возможности быстрых конформационных переходов от одной формы молекулы к другой в результате воздействия модификаторов как алиментарной, так и не алиментарной природы (Кузьмина, 1987; Уголев, Кузьмина, 1993; Неваленный и др., 2003).

Особого следует отметить, что сопоставление температурной зависимости протеиназ энтеральной микробиоты и рыб подтвердило, что микроорганизмы, по-видимому, представители рр. *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Vibrio*, синтезирующие протеиназы, гидролизующие те же субстраты, что и ферменты, синтезируемые пищеварительной системой рыб (Лубянскене и др., 1989; Шивокене, 1989; Кузьмина, 2005), имеют несколько иные характеристики. В частности, относительная активность протеиназ энтеральной микробиоты в зоне низких температур составляет 20–40% максимальной активности. Этот факт дает подтверждает, что ферменты микробиоты способны компенсировать относительно низкую активность протеиназ, синтезируемых поджелудочной железой рыб, при низкой температуре. При этом они играют важную роль в температурных адаптациях ферментных систем пищеварительного тракта рыб.

Данные, касающиеся протеиназ потенциальных объектов питания рыб, свидетельствуют о принципиальном сходстве температурных характеристик казеинлитических протеиназ всех тканей

организма исследованных видов (преимущественно мышцы) с таковыми слизистой оболочки кишечника консументов (Уголев, Кузьмина, 1993; Кузьмина, Ушакова, 2009; Кузьмина и др., 2015). Однако при этом были выявлены различия, свидетельствующие о зависимости температурных характеристик протеиназ тканей потенциальных объектов питания рыб от филогенетических особенностей вида. Особо следует отметить, что, несмотря на близость температурных характеристик протеиназ слизистой оболочки кишечника консументов и тканей всего организма потенциальных жертв, относительная активность гемоглобинлитических протеиназ последних в зоне низких температур может быть выше таковой консументов. Эти факты позволяют предположить, что гемоглобинлитические протеиназы объектов питания рыб также могут компенсировать относительно низкую активность протеиназ, синтезируемых рыбами, при низкой температуре. Поскольку ранее был доказан значительный вклад ферментов жертвы в пищеварение рыб, особенно ихтиофагов (Кузьмина, 2000, 2005; Кузьмина, Скворцова, 2003; Kuz'mina, Golovanova, 2004; Kuz'mina, 2008; Ушакова, Кузьмина, 2010), выявленные адаптации протеиназ свидетельствуют о большей роли индуцированного аутолиза в процессах деградации белковых компонентов пищи, чем предполагалось ранее.

Таким образом, при исследовании рыб Рыбинского водохранилища на фоне общих для позвоночных закономерностей был выявлен ряд особенностей. Для рыб характерна более низкая активность одноименных гидролаз по сравнению с высшими позвоночными, что обусловлено их эвритермностью и обитанием в «гипогравитационной» водной среде. У некоторых видов рыб отмечена большая относительная активность некоторых собственных ферментов, также ферментов энтеральной микрофлоры и объектов питания в зоне низких температур, имеющая адаптивное значение. Тип питания рыб влияет не только на активность, но и на характеристики ферментов, некоторые из которых, в частности ферменты, находящиеся в начале ферментативной цепи, отличаются адаптивными свойствами. Ферменты энтеральной микрофлоры и объектов питания вносят значительный вклад в процессы пищеварения у рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Герасимов Ю.В., Стрельников А.С. Бражник С.Ю. Динамика и состояние запасов рыб Рыбинского водохранилища в период 1950–2010 гг. // Вопросы ихтиол. 2013 Т. 53. № 4. С. 465–478. Gerasimov Yu.V., Strel'nikov A.S., Brazhnik S.Yu. Dinamika i sostoyanie zapasov ryb Rybinskogo vodokhranilishcha // Voprosy ikhtologii. 2013. T. 53. № 4. S. 465–478. [Gerasimov Yu.V., Strel'nikov A.S., Brazhnik S.Yu. The dynamics and the state of fish stocks in the Rybinsk reservoir during 1950–2010 years // J. Ichthyol. 2013 Vol. 53. No. 4. P. 465–478.] In Russian.
- Веригина И.А., Жолдасова И.М. Эколого-морфологические особенности пищеварительной системы костистых рыб. Ташкент: Фан, 1982. 154 с. Verigina I.A., Zholdasova I.M. Ekologo-morfologicheskie osobennosti pishchevaritel'noi sistemy kostistyx ryb. Tashkent: Fan, 1982. 154 s. [Verigina I.A., Zholdasova I.M. Ecological and morphological characteristics of the digestive system of bony fishes. Tashkent. Fan. 1982. 154 p.] In Russian.
- Голованова И.Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. 2006. С-Пб. 46 с. Golovanova I.L. Vliyanie prirodnykh i antropogennykh faktorov na gidroliz uglevodov u ryb i ikh ob'ektov pitaniya. Avtoref. Diss. ... Dokt. Biol. Nauk. 2006. S-Pb. 46 s. [Golovanova I.L. Influence of natural and anthropogenic factors on the hydrolysis of carbohydrates in fish and their preys. Thesis Dis. ... Doctor Biol. Sciences. 46 p.] In Russian.
- Иванова М.Н., Половкова С.Н., Кияшко В.И., Баканов А.И. Питание и пищевые взаимоотношения рыб в водохранилищах Волжского каскада / Теоретические аспекты рыбохозяйственных исследований водохранилищ. Л.: Наука, 1978. С. 55–77. Ivanova M.N., Polovkova S.N., Kiyashko V.I., Bakanov A.I. Pitaniye i pishchevye vsaimootnosheniya ryb v vodokhranilishchakh Volzhskogo kaskada / Teoreticheskie aspekti ribokhozyaistvennykh issledovaniy vodokhranilishch. L. Nauka. S. 55–77. [Ivanova M.N., Polovkova S.N., Kiyashko V.I., Bakanov A.I. Feeding and food relationship of fish in the reservoirs of the Volga cascade / Theoretical aspects of fisheries research of reservoirs. L. Science. P. 55–77.] In Russian.
- Ильина И.Д., Турецкий В.И. Развитие пищеварительной функции у рыб // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27. № 5. С. 835–843. Il'ina I.D., Turetskiy V.I. Rasvitiye pishchevaritel'noi funktsii u ryb // Voprosy ikhtologii. 1987. T. 27. № 5. S. 835–843. [Il'ina I.D., Turetskiy V.I. The development of digestive function in fish // J. Ichthyol. 1987. Vol. 27. No. 5. P. 835–843.] In Russian.
- Клейменов И.Я. Химический и весовой состав рыб в водоемах СССР и зарубежных стран. М.: Рыбн. хоз-во, 1962. 143 с. Kleimenov I.Ya. Khimicheskiy i vesovoi sostav ryb v vodoemakh SSSR i zarubezhnykh stran. M.: Ribn. Hozyaistvo, 1962. 143 p. [Kleimenov I.Ya. The chemical composition and weight of fish in the waters of the USSR and foreign countries. M.: Fisheries, 1962. 143 p.] In Russian.
- Коновалов Ю.Д. Свойства, локализация, роль и возможные пути регуляции активности протеиназ и аминотрансфераз в раннем онтогенезе рыб // Успехи соврем. биол. 1986. Т. 101. Вып. 3. С. 359–373. Konovalov Yu.D. Svoistva, lokalizatsiya, rol' i vozmozhnye puti regulyatsii aktivnosti proteinaz i aminotransferaz v rannem ontogeneze ryb // Uspehi sovrem. biol. 1986. T. 101. Vyp. 3. S. 359–373. [Konovalov Yu.D. Properties, localization,

- role and possible ways of regulating the activity of proteinases and aminotransferases in early ontogenesis of fishes // *Biology Bulletin Reviews*. 1986. Vol. 101. Iss. 3. P. 359–373.] In Russian.
- Коржуев П.А. Гемоглобин. Сравнительная физиология и биохимия. М.: Наука, 1964. 286 с. Korzhuev P.A. Hemoglobin. *Sravnitel'naya fiziologiya i biokhimiya*. M.: Nauka, 1964. 286 s. [Korzhuev P.A. Hemoglobin. Comparative physiology and biochemistry. M.: Science, 1964. 286 p.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Особенности мембранного пищеварения у пресноводных костистых рыб // *Вопр. ихтиологии*. 1977. Т. 17. № 1. С.111–119. Kuz'mina V.V. Osobennosti membrannogo pishchevareniya u presnovodnykh ryb. *Voprosy ikhtiologii*. 1977. T. 17. № 1. S.111–119. [Kuz'mina V.V. Peculiarities of the membrane digestion in freshwater teleosts // *J. Ichthyol*. 1977. Vol. 17. No. 1. P. 99–107.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Мембранное пищеварение у круглоротых и рыб // *Вопр. ихтиол.* 1978. Т. 18. № 4. С. 684–696. Kuz'mina V.V. Membrannoe pishchevarenie u kruglorotykh i ryb // *Vopr. ikhtiol*. 1978. T. 18, № 4. S. 684–696. [Kuz'mina V.V. Membrane digestion in cyclostomes and fish // *J. Ichthyol*. 1978. Vol. 18. No. 4. P. 599–611.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Уровень активности α -амилазы в крови у пресноводных костистых рыб // *Вопр. ихтиол.* 1979. Т. 19. № 2. С. 332–340. Kuz'mina V.V. Uroven' aktivnosti α -amilazy v krovi u presnovodnykh kostistykh ryb // *Vopr. ikhtiol*. 1979. T. 19, № 2. S. 332–340. [Kuz'mina V.V. Level of α -amylase activity in the blood of fresh water teleosts // *J. Ichthyol*. 1979. Vol. 19. No. 2. P. 123–131.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Сезонная и возрастная изменчивость активности α -амилазы у леща // *Вопр. ихтиологии*. 1980. Т. 20. № 1. С.128–133. Kuz'mina V.V. Sezonnaya i vozrastnaya izmenchivost' aktivnosti α -amilazy u leshcha // *Vopr. ikhtiologii*. 1980. T. 20. № 1. S.128–133. [Kuz'mina V.V. Seasonal and age-related changes in α -amylase activity in the bream // *J. Ichthyol*. 1980. Vol. 20. No. 1. P. 105–110.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Нутритивные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб // *Журн. общ. биологии*. 1981. Т. 42. № 2. С. 258–265. Kuz'mina V.V. Nutritivnye adaptatsii fermentov, osushchestvlyayushchikh membrannoe pishchevarenie u presnovodnykh kostistykh ryb // *Zhurn. obshch. biologii*. 1981. T. 42. № 2. S. 258–265. [Kuz'mina V.V. Nutrition adaptation of enzymes, realizing the membrane digestion in freshwater teleosts // *J. General Biol*. 1981. Vol. 42. No. 2. P. 258–265.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Об оценке биохимического состава и калорийности основных энергетических компонентов кормовых объектов рыб / Ошибки методов гидробиологических исследований. Рыбинск. 1982. С.135–143. Kuz'mina V.V. Ob otsenke biokhimicheskogo sostava i kaloriinosti osnovnykh energeticheskikh komponentov kormovykh ob'ektov ryb / Oshibki metodov gidrobiologicheskikh issledovaniy. Rybinsk. 1982. S.135–143. [Kuz'mina V.V. On the estimation of the chemical composition and calorific value of major energy components of fish preys / The errors of the methods in hydrobiological studies. Rybinsk. 1982. P.135–143.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Температурные адаптации ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у пресноводных костистых рыб // *Журн. общей биол.* 1985. Т.46. №6. С. 824–837. Kuz'mina V.V. Temperaturnye adaptatsii fermentov, osushchestvlyayushchikh membrannoe pishchevarenie u presnovodnykh kostistykh ryb // *Zhurn. obshchey biol*. 1985. T.46. № 6. S. 824–837. [Kuz'mina V.V. Temperature adaptation of enzymes realising membrane digestion in freshwater teleosts // *J. General Biol*. 1985. Vol. 46. No. 6. P. 824–837.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Регуляторные свойства ферментов, обеспечивающих процессы мембранного пищеварения у рыб // *Журн. общей биол.* 1987. Т. 48. № 6. С. 828–838. Kuz'mina V.V. Regulyatornye svoistva fermentov, obespechivaushchikh protsessy membrannogo pishchevareniya u ryb // *Zhurn. obshchei biol*. 1987. T. 48. № 6. S.828–838. [Kuz'mina V.V. Regulatory properties of the enzymes realizing membrane digestion in fish // *J. General Biol*. 1987. Vol. 48. No. 6. P. 828–838] In Russian.
- Кузьмина В.В. Влияние температуры на уровень общей протеолитической активности пищеварительного тракта у некоторых видов пресноводных костистых рыб // *Вопр. ихтиол.* 1990. Т. 30. № 4. С. 668–677. Kuz'mina V.V. Vliyanie temperatury na uroven' obshchei proteoliticheskoi aktivnosti pishchevaritel'nogo trakta u nekotorykh vidov presnovodnykh kostistykh ryb // *Vopr. ikhtiol*. 1990. T. 30. № 4. S. 668–677. [Kuz'mina V.V. Temperature influence on the total level of proteolytic activity in the digestive tract of some species of freshwater fishes // *J. Ichthyol*. 1990. Vol. 30. No. 7. P. 97–100.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Роль индуцированного аутолиза в процессах пищеварения у животных (на примере рыб) // *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1993. Т. 79. № 6. С. 102–108. Kuz'mina V.V. Rol' indutsirovannogo autoliza v processakh pishchevareniya u zhivotnykh (na primere ryb) // *Fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 1993. T. 79. № 6. S. 102–108. 79. [Kuz'mina V.V. The role of induced autolysis in digestive processes of fish // *I.M. Sechenov Physiol. J*. 1993. Vol. 79. No. 6. P. 102–108.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Вариабельность активности некоторых ферментов слизистой кишечника рыб // *Журн. эвол. биохим. физиол.* 1994. Т. 30. № 6. С. 753–761. Kuz'mina V.V. Variabel'nost' aktivnosti nekotorykh fermentov slizистой kishchnika ryb // *Zhurn. evol. biokhim. fiziol*. 1994. T. 30. № 6. S. 753–761. [Kuz'mina V.V. Variability of the activities of some enzymes of intestinal mucosa in fish // *J. Evol. Biochem. Physiol*. 1994. Vol. 30. No. 6. P. 753–761.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Трофология рыб (физиолого-биохимические аспекты) // *Биол. внутр. вод.* 1996. № 1. С. 86–93. Kuz'mina V.V. Trofologiya ryb (fiziologo-biokhimicheskie aspekty) // *Biol. vnutr. vod*. 1996. № 1. S. 86–93. [Kuz'mina V.V. Trophology of fish (physiology and biochemistry aspects) // *Biol. Inland Waters*. 1996. No. 1. P. 14–23.] In Russian.

- Кузьмина В.В. Влияние температуры на пищеварительные гидролазы беспозвоночных животных // Журн. эвол. биохим. физиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 15–19. Kuz'mina V.V. Vliyanie temperatury na pishchevaritel'nye gidrolazy bespozvonochnikh zhivotnikh // Zhurn. evol. biokhim. fiziol. 1999. T. 35. № 1. S. 15–19. [Kuz'mina V.V. Influence of temperature on digestive hydrolases in water invertebrates // J. Evol. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 35. No. 1. P. 15–19.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Вклад индуцированного аутолиза в процессы пищеварения вторичных консументов на примере гидробионтов // Докл. РАН. 2000. Т. 339. № 1. С. 172–174. Kuz'mina V.V. Vklad indutsirovannogo autoliza v protsessy pishchevareniya vtorichnikh konsumentov na primere gidrobiontov // Dokl. RAN. 2000. T. 339. № 1. S. 172–174. [Kuz'mina V.V. Contribution of induced autolysis to the digestive processes in secondary consumers (Ex-amplified by hydrobionts) // Dokl. Biol. Sci. 2000. Vol. 373. Nos. 1–6. P. 379–382.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Гормональная регуляция метаболизма и процессов экзотрофии у рыб. Полифункциональность и полипотентность // Журн. эвол. биохим. физиол. 2000. Т. 36. № 6. С. 514–523. Kuz'mina V.V. Gormonal'naya regulyatsiya metabolizma i protsessov ekzotrofii u ryb. Polifunksional'nost' i polipotentnost' // Zhurn. evol. biokhim. fiziol. 2000. T. 36. № 6. S. 514–523. [Kuz'mina V.V. Hormonal regulation of metabolism and processes of exotrophy in fish. Polyfunctionality and polypotentiality (Review) // J. Evol. Biochem. Physiol. 2000. Vol. 36. No. 6. P. 514–523.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Физиологические адаптации (на примере процесса экзотрофии у рыб) // Журн. эволюц. биохим. физиол. 2001. Т. 37. № 3. С. 215–224. Kuz'mina V.V. Fiziologicheskie adaptatsii (na primere protsessa ekzotrofii u ryb) // Zhurn. evol. biokhim. fiziol. 2001. T. 37. № 3. S. 215–224. [Kuz'mina V.V. Physiological adaptation (By the example of the exotrophy process in fish) // J. Evol. Biochem. Physiol. 2001. Vol. 37. No. 3. P. 285–299.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Физиолого-биохимические основы экзотрофии рыб. М.: Наука, 2005. 300 с. Kuz'mina V.V. Fiziologo-biolhimicheskie osnovy ekzotrofii ryb. M.: Nauka, 2005. 300 s. [Kuz'mina V.V. Physiological and biochemical principles of exotrophy processes in fish. (Ed. V.N. Yakovlev). M.: Science, 2005. 300 p.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Физиология питания рыб. Влияние внешних и внутренних факторов. Борок: ИБВВ РАН. 2008. 276 с. Kuz'mina V.V. Fiziologiya pitaniya ryb. Vliyanie vneshnikh i vnutrennikh faktorov. Borok: IBVV RAN. 2008. 276 s. [Kuz'mina V.V. Physiology of feeding in fish. Influence of external and internal factors. (Ed. Ju.V. Gerasimov). Borok: IBW RAS. 2008. 276 p.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Гельман А.Г. Особенности становления пищеварительной функции рыб // Вопр. ихтиологии. 1998. Т. 38. № 1. С. 113–122. Kuz'mina V.V., Gel'man A.G. Osobennosti stanovleniya pishchevaritel'noi funktsii ryb // Vopr. ikhtiologii. 1998. T. 38. № 1. S. 113–122. [Kuz'mina V.V. Traits in the development of the digestive function in fishes // J. Ichthyol. 1998. Vol. 38. No. 1. P. 106–115.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Жилина Л.П. Соотношение концентрации гликогена в печени и мышцах некоторых пресноводных костистых рыб // Вопр. ихтиологии. 1973. Т. 13. № 4. С. 740–744. Kuz'mina V.V., Zhilina L.P. Sootnoshenie kontsentratsii glikogena v pecheni i mishtsakh nekotorykh presnovodnikh kostistyykh ryb // Vopr. ikhtiologii. 1973. T. 13. № 4. S. 740–744. [Kuz'mina V.V., Zhilina L.P. The correlation of glycogen concentration in liver and muscles of some fresh water teleosts // J. Ichthyol. 1973. Vol.13. No. 4. P. 740–744.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Неваленный А.Н. Влияние концентрации водородных ионов на активность карбогидраз пищеварительного тракта рыб // Вопросы ихтиологии. 1983. Т.23. № 1. С. 481–490. Kuz'mina V.V., Nevalen-niy A.N. Vliyanie kontsentratsii vodorodnykh ionov na aktivnost' karbogidraz pishchevaritel'nogo trakta ryb // Vo-prosi ikhtiologii. 1983. T. 23. № 1. S. 481–490. [Kuz'mina V.V., Nevalenniy A.N. Effect of hydrogen ion concen-tration on the activity of some carbohydrases in the fish digestive tract // J. Ichthyol. 1983. Vol. 23. No. 3. P. 114–123.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г. Вклад протеолитических ферментов объектов питания в процессы пищеварения хищных рыб // Вопр. ихтиологии. 2003. Т. 43. № 2. С. 209–214. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G. Vklad proteo-liticheskikh fermentov ob'ektov pitaniya v protsessy pishchevareniya khishchnyykh ryb // Voprosy ikhtiologii. 2003. T. 43. № 2. S. 209–214. [Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G. Contribution of dietary proteolytic enzymes to digestion processes of carnivorous fish // J. Ichthyol. 2003. Vol. 43. No. 2. P. 175–180.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Соломатин Ю.И. Состояние ферментных систем пищеварительного тракта у леща *Abramis brama* (L.) и плотвы *Rutilus rutilus* (L.) Рыбинского водохранилища в период 1970–2012 гг. // Пробл. биол. продукт. жив. 2014. № 1. С. 42–47. Kuz'mina V.V., Solomatin Yu.I. Sostoyanie fermentnykh sistem pishchevaritel'nogo trakta u leshcha *Abramis brama* (L.) i plotvy *Rutilus rutilus* (L.) Rybinskogo vodokhranilishcha v period 1970–2012 gg. // Probl. biol. produkt. zhiv. 2014. № 1. S. 42–47. [Kuz'mina V.V. Solomatin Yu.I. Status of enzyme systems of digestive tract of bream *Abramis brama* (L.) and roach *Rutilus rutilus* (L.) in Rybinsk reser-voir during the period 1970–2012 years // Problems biol. product. anim. 2014. № 1. P. 42–47.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Стрельникова А.П. Влияние суточных ритмов питания на общую амилолитическую активность и активность щелочной фосфатазы кишечника у молоди рыб // Биология внутренних вод. 2008. № 2. С. 81–90. Kuz'mina V.V., Strel'nikova A.P. Vliyanie sutochnyykh ritmov pitaniya na obshchuyu amiloliticheskuyu aktivnost' i aktivnost' shchelochnoi fosfatazy kishhechnika u molodi ryb // Biologiya vnutrennikh vod. 2008. № 2. S. 81–90. [Kuz'mina V.V., Strel'nikova A.P. Influence of daily rhythms of feeding on intestinal amylolytic and alkaline phos-phatase activity in some fish larvae and juveniles // Inland Water Biology. 2008. No. 2. P. 89–98.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Ушакова Н.В. Протеиназы тюльки *Clupeonella cultriventris* (Nordmann) Рыбинского водохрани-лища // Вопр. ихтиологии. 2009. Т. 49. № 2 С. 277–283. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Proteinazy tyul'ki *Clu-*

- peonella cultriventrис* (Nordmann) Rybinskogo vodokhranilishcha // Vopr. ikhtiologii. 2009. T. 49. № 2. S. 277–283. [Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Proteinases of kilka *Clupeonella cultriventrис* (Nordmann) of the Rybinsk reservoir // J. Ichthyol. 2009. Vol. 49. No. 2. P. 277–283.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Латов В.К., Посконова Е.А. Молекулярно-массовые характеристики белковых компонентов некоторых кормовых объектов рыб // Биол. внутр. вод: Информ. бюл. 1990. № 88. С 73–77. Kuz'mina V.V., Latov V.K., Poskonova E.A. Molekulyarno-massovye kharakteristiki belkovikh komponentov nekotorykh kormovykh ob'ektov ryb // Biol. vnutr. vod: Inform. bull. 1990. № 88. S 73-77. [Kuz'mina V.V., Latov V.K., Poskonova E.A. The molecular-weight characteristics of the protein components of some prey fish // Biol. Inland Water: Inform. Bull. 1990. № 88. P. 73–77.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Шалыгин М.В. Влияние температуры на активность протеиназ потенциальных объектов питания рыб-ихтиофагов // Биол. внутр. вод. 2015. № 4. С. 76-83. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V. Vliyanie temperatury na aktivnost' proteinaz potencial'nykh ob'ektov pitaniya ryb-ikhtiofagov // Biol. vnutr. vod. 2015. № 4. S. 76-83. [Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Shalygin M.V. The effect of temperature on the activity of proteases in potential preys of fish-ichthyophagous // Inland Water Biology. 2015. No. 4. P. 76–83.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Ландсберг Д.Е., Голованова И.Л., Извекова Г.И. Изменение активности карбогидраз в течение онтогенеза щуки (*Esox lucius* L.). // Биол. внутр. вод. Информ.бюлл. 1982. № 54. С. 58–61. Kuz'mina V.V., Landsberg G.E., Golovanova I.L., Izvekova G.I. Izmenenie aktivnosti karbogidraz v techenie ontogeneza shchuki (*Esox lucius* L.) // Biol. vnutr. vod. Inform. bull. 1982. No. 54. S. 58–61. [Kuz'mina V.V., Landsberg G.E., Golovanova I.L., Izvekova G.I. Changes in the activity of carbohydrases during ontogeny of pike (*Esox lucius* L.). // Biol. Inland Waters. Inform. Bull. 1982. No. 54. P. 58–61.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Корнилова Н.Ю., Николаичев К.А. Активность протеиназ в организме молоди рыб — потенциальных объектов питания хищных рыб // Вестник АПК Верхневолжья. 2013. №3 (23). С. 54–59. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Kornilova N.Y., Nikolaichev K.A. Aktivnost' proteinaz v organizme molodi ryb — potentsial'nykh ob'ektov pitaniya khishchnykh ryb // Vestnik APK Verkhnevolzh'ya. 2013. №3 (23). S. 54–59. [Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Kornilova N.Y., Nikolaichev K.A. The activity of proteases in the body of young fish — potential preys of predatory fish // Herald APK Upper Volga. 2013. №3 (23). P. 54–59.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Скворцова Е.Г., Лузанова К.А., Лебедев Д.С., Николаичев К.А. Влияние температуры на активность пептидаз потенциальных объектов питания рыб разных экологических групп // Пробл. биол. продукт. жив. 2014. №4. С.35–45. Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Luzanova K.A., Lebedev D.S., Nikolaichev K.A. Vliyanie temperatury na aktivnost' peptidaz potentsial'nykh ob'ektov pitaniya ryb raznykh ekologicheskikh grupp // Probl. biol. produkt. zhiv. 2014. № 4. S. 35–45. [Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Luzanova K.A., Lebedev D.S., Nikolaichev K.A. The effect of temperature on the activity of peptidases in potential preys of different ecological groups of fishes // Probl. biol. product. anim. 2014. № 4. P. 35–45.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Лисицкая М.Б., Половкова С.Н., Силкина Н.И., Боканов А.И. Биохимический состав некоторых кормовых объектов рыб Рыбинского водохранилища // Биол. внутр. вод. Инф. бюл. 1979. № 44. С. 58–61. Kuz'mina V.V., Lisitskaya M.B., Polovkova S.N., Silkina N.I., Bakanov A.I. Biokhimicheskiy sostav nekotorykh kormovykh ob'ektov ryb Rybinskogo vodokhranilishcha // Biol. vnutr. vod. Inf. bull. 1979. № 44. S. 58–61. [Kuz'mina V.V., Lisitskaya M.B., Polovkova S.N., Silkina N.I., Bakanov A.I. The biochemical composition of some preys of fish in the Rybinsk reservoir // Biol. Inl. Waters. Inf. Bull. 1979. No. 44. P. 58–61.] In Russian.
- Кулемин А.А. Промысловая икhtiофауна бассейна р. Волги в связи с проблемами рыбохозяйственного освоения Рыбинского водохранилища // Уч. записки ЯрПИ. 1944. № 2. С. 64–100. Kulemin A.A. Promyslovaya ikhtiofauna basseina r. Volgi v svyazi s problemami rybokhozyaistvennogo osvoeniya Rybinskogo vodokhranilishcha // Uch. zapiski YarPI. 1944. № 2. S. 64–100. [Kulemin A.A. A commercial fish fauna of Volga River basin in connection with the problems of the fisheries development of the Rybinsk Reservoir // Scientific Notes of YarPI. 1944. No. 2. P. 64–100.] In Russian.
- Лубянской В., Вирбицкас Ю., Янкявичус К., Лясаускене Л. и др. Obligatный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма. Вильнюс: Мокслас, 1989. 191 с. Lubyanskene V., Virbitskas Yu., Yankyavichus K., Lyasauskene L. i dr. Obligatnyi simbioz mikroflory pishchevaritel'nogo trakta i organizma. Vil'nyus: Mokslas. 1989. 191 s. [Lubyanskene V., Virbitskas Yu., Yankyavichus K., Lyasauskene L. et al. Obligate symbiotic microflora of digestive tract and organism. Vilnius: Mokslas, 1989. 191 p.] In Russian.
- Маляревская А.Я., Биргер Т.И. Биохимический состав производителей, икры и личинок тарани и леща / Влияние качества производителей на потомство рыб. Киев: Наукова думка, 1965. С. 5–34. Malyarevskaya A.Ya., Birger T.I. Biokhimicheskiy sostav proizvoditelei, ikry i lichinok tarani i leshcha / Vliyanie kachestva proizvoditelei na potomstvo ryb. Kiev: Naukova dumka, 1965. S. 5–34. [Malyarevskaya A.Ya., Birger T.I. The biochemical composition of the spawners, eggs and larvae of roach and bream // Influence of spawners quality on the breed of fish. Scientific Thought. 1965. P. 5–34.] In Russian.
- Неваленный А. Н., Туктаров А. В., Бедняков Д. А. Функциональная организация и адаптивная регуляция процессов пищеварения у рыб. Астрахань: АГТУ, 2003. 152 с. Nevalenniy A.N., Tuktarov A.V., Bednyakov D.A. Funktsional'naya organizatsiya i adaptivnaya regulyatsiya protsessov pishchevareniya u ryb. Astrahan': AGTU, 2003. 152 s. [Nevalenniy A.N., Tuktarov A.V., Bednyakov D.A. Functional organization and adaptive regulation of the digestive processes in fish. Astrakhan: Astrakhan State Technical University, 2003. 152 p.] In Russian.

- Поддубный А.Г. Экологическая топография популяций рыб в водохранилищах. Л.: Наука. 1971. 312 с. Poddubnyy A.G. Ekologicheskaya topografiya populyatsiy ryb v vodokhranilishchakh. L.: Nauka. 1971. 312 s. [Poddubnyy A.G. Environmental topography of fish populations in reservoirs. L.: Science, 1971. 312 p.] In Russian.
- Розенберг Г.С., Мозговой Д.П., Гелашвили Д.Б. Экология. Элементы теоретических конструкций современной экологии. Самара: Самарский научный центр РАН, 2000. 396 с. Rozenberg G.S., Mozgovoy D.P., Gelashvili D.B. Ekologiya. Elementy teoreticheskikh konstruktssii sovremennoi ekologii. Samara: Samarskiy nauchnyy tsestr RAN, 2000. 396 s. [Rozenberg G.S., Mozgovoy D.P., Gelashvili D.B. Ecology. Elements of theoretical constructions of modern ecology. Samara: Samara Scientific Center RAS, 2000. 396 p.] In Russian.
- Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты). М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 247 с. Sorvachev K.F. Osnovy biokhimii pitaniya ryb (ekologo-biokhimicheskie aspekty). M.: Legkaya i pishcheyaya promyshlennost', 1982. 247 s. [Sorvachev K.F. Principles of biochemistry of fish nutrition (ecological and biochemical aspects). M.: Light and Food Industry, 1982. 247 p.] In Russian.
- Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 358 с. Ugolev A.M. Membrannoye pishchevarenie. Polisubstratnyye protsessy, organizatsiya i regulyatsiya. L.: Nauka, 1972. 358 s. [Ugolev A.M. The membrane digestion. Polysubstrate processes, organization, and regulation. L.: Science, 1972. 358 p.] In Russian.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб: Гидрометеиздат, 1993. 238 с. Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. Pishchevaritel'nyye protsessy i adaptatsii u ryb. SPb: Gidrometeoizdat, 1993. 238 s. [Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. Digestive processes and the adaptation in fish. St. Petersburg: Gidrometeoizdat, 1993. 238 p.] In Russian.
- Ушакова Н.В., Кузьмина В.В. Активность протеиназ у рыб разных экологических групп и их потенциальных объектов питания // *Вопр. ихтиологии*. 2010. Т. 50. № 4. С. 554–560. Ushakova N.V., Kuz'mina V.V. Aktivnost' proteinaz u ryb raznykh ekologicheskikh grupp i ikh potentsial'nykh ob'ektov pitaniya // *Vopr. Ikhtiologii*. 2010. T. 50. № 4. S. 554–560. [Ushakova N.V., Kuz'mina V.V. Proteinase activity in the fish of different ecological groups and their potential food items // *J. Ichthyol.* 2010. Vol. 50. No. 4. P. 554–560.] In Russian.
- Ушакова Н.В., Кузьмина В.В. Протеиназы потенциальных объектов питания рыб // *Журн. эволюц. биохим. физиол.* 2011. Т. 47. № 2. С. 142–150. Ushakova N.V., Kuz'mina V.V. Proteinazy potentsial'nykh ob'ektov pitaniya ryb // *Zhurn. evol. biokhim. fiziol.* 2011. T. 47. № 2. S. 142–150. [Ushakova N.V., Kuz'mina V.V. Proteases of potential objects of fish nutrition // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2011. Vol. 47. No. 2. P. 142–150.] In Russian.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 288 с. Shatunovskiy M.I. Ekologicheskie zakonomernosti obmena veshchestv morskikh ryb. M.: Nauka, 1980. 288 s. [Shatunovskiy M.I. Ecological regularities of metabolism in marine fish. M.: Science, 1980. 288 p.] In Russian.
- Шерстюк В.В. Некоторые биохимические показатели и калорийность икры фитофильных рыб // *Гидробиол. ж.* 1971. Т. 14. № 5. С. 63–66. Sherstuk V.V. Nekotorye biokhimicheskie pokazateli i kaloriynost' ikry fitofil'nykh ryb // *Gidrobiol. zhurn.* 1971. T.14. № 5. S. 63–66. [Sherstuk V.V. Some biochemical parameters and caloric value of phytophilic fish eggs // *Hydrobiol. J.* 1971. Vol. 14. No. 5. P. 63–66.] In Russian.
- Шивокене Я.С. Симбионтное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас, 1989. 223 с. Syvokene Ya.S. Simbiontnoye pishchevarenie u gidrobiontov i nasekomykh. Vil'nyus: Mokslas, 1989. 223 s. [Syvokene Ya.S. Symbiotic digestion in aquatic organisms and insects. Vilnius: Mokslas, 1989. 223 p.] In Russian.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 367 с. Shul'man G.E. Fiziologo-biokhimicheskie osobennosti godovykh tsiklov ryb. M.: Pishcheyaya promyshlennost', 1972. 367 s. [Shul'man G.E. Physiological and biochemical characteristics of the annual cycle of fish. M.: Food Industry, 1972. 367 p.] In Russian.
- Bakke A.M., Glover C., Krogdahl A. Feeding, digestion of nutrients and absorption // *Multifunctional gut of fish. Fish physiology* / Eds. Grossel M., Farrell A.P., Brauner C.J. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. 2010 Vol. 30 P. 57–110.
- Barrington E.J.W. The alimentary canal and digestion // *The physiology of fishes*. New York – London: Acad. Press. 1957. Vol. I. P. 109–161.
- Begon M., Harper J.L., Townsend C. Ecology. Individuals, populations and communities. 2-nd edition Boston – Oxford – London – Edinburgh – Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1990.
- Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep A.I. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and relations with diet // *Acta Physiol. Scand.* 1997. P. 67–80.
- Buddington R.K., Williams C.H., Nagata Y. Fermentable fibers and the gastrointestinal tract bacteria: comparisons of fiber types and mouse strains // *Microb. Ecol. Health Disease*. 2000. Vol. 12. P. 225–232.
- Chakrabarti I., Gani Md. A., Chaki K. K., Sur R., Misra K. K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995, Vol. 112A. P. 167–177.
- Fänge R., Grove D. Digestion // *Fish Physiology*. Eds. Hoar W.S., Randall D.J., Brett J. R. New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1979. Vol. 8. P. 162–260.
- Ganguly S., Prasad A. Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism // *Rev. Fish Biol. Fisheries* 2012. Vol. 22. P. 11–16.
- Gelman A.G., Kuz'mina V.V., Drabkin V., Glatman M. Temperature adaptations of fish digestive enzymes / In: *Feeding and Digestive Functions in Fishes*. Eds. J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor. Ch. 5. Enfield, NH etc.: Science Publishers, 2008. P. 155–226.

- Hidalgo M.C., Uera E., Sanz A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities // *Aquaculture*. 1999. Vol. 170. No. 3–4. P. 267–283.
- Krogdahl A., Hemre G. I., Mommsen T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. // *Aquaculture Nutrition*. 2005. V. 11. P. 103–122.
- Kuz'mina V.V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts // *Aquaculture*. 1996. Vol. 148. P. 25–37.
- Kuz'mina V.V. Classical and modern conceptions of fish digestion. In: *Feeding and Digestive Functions in Fishes*. Eds. J.E.P. Cyrino, D. Bureau, B.G. Kapoor. Ch. 4. Enfield, NH etc: Science Publishers, 2008. P. 85–154.
- Kuz'mina V.V., Gelman A.G. Membrane-linked digestion // *Rev. Fish Sci.* 1997. Vol. 5. No. 2. P. 99–129.
- Kuz'mina V.V., Golovanova I. L. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion // *Aquaculture*. 2004. Vol. 234. P. 347–360.
- Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. The dependence on temperature and pH of the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the digestive tract mucosa in piscivorous fish and their potential preys // *Fish Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 36. No. 3. P. 787–795.
- Kuz'mina V.V., Ushakova N.V. Influence of temperature and pH on the effects of zinc and copper on proteolytic activities of the intestinal mucosa of planktivorous and benthophagous fishes and their potential preys // *Toxicol. Environ. Chem.* 2013. Vol. 95. No. 1. P. 150–162.
- Kuz'mina V.V., Golovanova I.L., Izvekova G.I. Influence of temperature and season on some characteristics of intestinal mucosa carbohydrases in six freshwater fishes // *Comp.Biochem.Physiol.* 1996. Vol. 113B. No. 2. P. 255–260.
- Kuz'mina V.V., Skvortsova E.G., Zolotareva G.V., Sheptitskiy V.A. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish // *Fish Physiol. Biochem.* 2011. Vol. 37. No. 3. P. 345–357.
- Papoutsoglou E. S., Lyndon A. R. Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance // *J. Fish Biol.* 2006. Vol. 69. P. 446–460.
- Poddubny A.G., Galat D.L. Habitat associations of upper Volga river fishes: effects of reservoirs // *Regulated Rivers: Research and Management*. 1995. Vol. 11. P. 67–84.
- Ray A.K., Ghosh K., Ringo E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review // *Aquacult. Nutr.* 2012. Vol. 18. P. 465–492.
- Shulman G.E., Love R.M. The biochemical ecology of marine fishes / *Advances in Marine Biology*. San Diego: Acad. Press. 1999. Vol. 36. 351 p.

THE REGULARITIES OF DIGESTION PROCESSES IN FISH FROM THE RYBINSK RESERVOIR (REVIEW)

V. V. Kuzmina

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences
152742 Borok, Yaroslavl, Nekouz, Russia, e-mail: vkuzmina@ibiw.yaroslavl.ru*

In the review the results of long-term research of activity and the different characteristics for digestive enzymes of fish of the Rybinsk reservoir related to different ecological groups according with types of nutrition are presented. Against the background of the general laws for vertebrates, singularities of fish caused by their life in the aquatic environment, eurythermality and character of nutrition are shown.

Key words: fish, Rybinsk reservoir, digestion, enzymes.

ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ ГЛИКОЗИДАЗЫ РЫБ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ (ОБЗОР)

И. Л. Голованова, В. К. Голованов

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: golovanova5353@mail.ru

Проанализировано влияние повышения температуры окружающей среды на характеристики гликозидаз (ферментов, гидролизующих углеводы) у рыб разных экологических групп. Показано влияние скорости повышения температуры водной среды на активность и температурные характеристики пищеварительных гликозидаз, а также их чувствительность к действию тяжелых металлов. При низких скоростях нагрева воды 0.04°C/ч (около 1°C/сут) рыбы в течение 2–4 недель могут акклиматизироваться к постепенному повышению температуры, и активность гликозидаз (амилолитическая активность, α -амилаза) увеличивается во все сезоны года. Более высокие скорости нагрева 4–50°C/ч повышают активность гликозидаз летом и, как правило, снижают ее в 2–7.5 раз в другие сезоны года. Резкое повышение температуры окружающей среды в осенне-зимний период, противоречащее сезонному ходу событий, не позволяет организму приспособиться к быстро меняющимся условиям и снижает эффективность начальных этапов ассимиляции пищи у рыб. Несмотря на рост активности гликозидаз с увеличением скорости нагрева воды в летний период снижение термостабильности ферментов и их устойчивости к действию тяжелых металлов может негативно влиять на интенсивность пищеварения в условиях теплового загрязнения. Поскольку температурные и трофические условия в значительной мере определяют эффективность питания рыб, изменения пищеварительной функции при постепенном или резком изменении температуры позволяют прогнозировать последствия глобального потепления климата, термального загрязнения водной среды, изоляции мелководных водоемов, а также рыбоводных работ, связанных с изменением температуры воды.

Ключевые слова: рыбы, пищеварение, гликозидазы, увеличение температуры среды.

Принято считать, что температурные и трофические условия среды в наибольшей степени определяют условия роста, накопления биомассы и, в конечном счете, продуктивность популяций рыб, обитающих в пресноводных водоемах (Бретт, 1983). В последние десятилетия наблюдается процесс глобального потепления климата, вызванный как естественными, так и антропогенными факторами (Изменения ..., 2002; Кляшторин, Любушин, 2005). В северной части умеренной климатической зоны зимы стали более теплыми, а в летнее время наблюдаются периоды экстремально высоких значений температуры, нередко достигающих в прибрежной части водоемов 30–32°C (Попова, 2003).

Температура является одним из важнейших абиотических факторов среды, определяющих основные параметры жизнедеятельности рыб. Некоторые виды рыб выдерживают колебания в несколько десятков градусов (эвритермные виды), другие приспособлены жить в более узком температурном диапазоне (стенотермные). Для видов, обитающих в умеренных широтах России, этот диапазон составляет приблизительно от 0 до 38°C (Шмидт-Нильсен, 1982). Изменение температуры приводит к значительным изменениям скорости метаболических процессов, темпа роста, интенсивности питания и скорости переваривания пищи (Alabaster, Lloyd, 1982). В то же время, даже кратковременные изменения температуры до значений, лежащих за границами метаболического оптимума, могут привести к нарушению равновесия обмена веществ, инактивации и денатурации ферментов, и, как следствие, к гибели организма (Константинов, 1979). Изучение температурной толерантности рыб становится все более актуальным в связи с проблемой антропогенного термического загрязнения водной среды сбросными подогретыми водами промышленных предприятий (Голованов, 2013а). Резкие нехарактерные для сезона изменения температуры воды в естественных водоемах наблюдаются в зонах сброса вод атомных и тепловых электростанций, часто используемых для рыборазведения. Наложение глобального потепления климата на локальное термическое загрязнение может привести к гибели гидробионтов даже при нормативном сбросе подогретой воды в естественные водоемы. Поэтому крайне важным становится не только выявление термоустойчивости разных видов рыб, но и оценка действия критических значений температуры на функционирование различных систем организма, в том числе и пищеварительной системы.

Известно, что ферменты пищеварительного тракта рыб хорошо адаптированы к температурным условиям среды обитания (Уголев и Кузьмина, 1993). В экспериментах *in vitro* установлено, что в зоне физиологической температуры наблюдается прямая зависимость между ростом температуры инкубационной среды и активностью пищеварительных гидролаз, обусловленная прямым влиянием температуры на ферменты. Значения температурного оптимума гликозидаз у пресноводных костистых рыб лежат в пределах 30–65°C, протеиназ, гидролизующих белки — в пределах 50–60°C (Уго-

лев, Кузьмина, 1993). Дальнейшее повышение температуры инкубационной среды, выходящее за пределы температурного оптимума ферментов, приводит к резкому снижению их активности.

Для анализа механизмов температурных адаптаций рыб к постоянно меняющимся условиям окружающей среды широко используют определение верхней летальной и сублетальной температуры при различных скоростях нагрева воды (от 0.01 до 60°C/ч). При этом установлены как видовые различия, так и зависимость этих показателей от возраста рыб, сезона года, температуры предварительной акклимации и скорости изменения температуры окружающей среды (Beitinger et al., 2000; Голованов, 2013б). Многие авторы отмечают значительное уменьшение уровня верхней летальной температуры зимой по сравнению с летом, что может являться вероятной причиной массовой гибели рыб при сбросах теплой воды в водоемы в зимний период. В опытах *in vivo* было установлено влияние повышения температуры акклимации на активность пищеварительных ферментов рыб (Hofeg, 1979; Кузьмина, Поддубная, 1986). В последние годы появился ряд работ по изучению активности пищеварительных гидролаз (преимущественно гликозидаз) кишечника рыб (Голованова, 2004, 2006; Голованова и др., 2002, 2005, 2009; Golovanova et al., 2013) и активности ацетилхолинэстеразы мозга (Голованов и др., 2015) в области верхних сублетальных значений температуры при различных скоростях нагрева воды.

Скорость повышения температуры окружающей среды может оказывать разное влияние на уровень активности гликозидаз в зависимости от вида рыб и сезона года (Golovanova et al., 2013). В экспериментах на молоди четырех видов рыб (каarp *Cyprinus carpio* (L.), карась серебряный *Carassius auratus* (L.), плотва *Rutilus rutilus* (L.) и окунь *Perca fluviatilis* L.) температуру воды в аквариумах повышали со скоростью 0 (контрольная группа), 0.04, 4, 10, 17, 32 и 50°C/ч до нарушения локомоторной функции рыб (поворот на бок). Значения температуры в этой точке соответствуют верхней сублетальной температуре, так называемый критический термический максимум (КТМ). Значения КТМ, полученные в этих экспериментах не превышали 40°C, а прекращение дальнейшего нагрева воды сохраняло жизнеспособность рыб. Уровень амилолитической активности (отражающей суммарную активность ферментов, гидролизующих полисахарид крахмал: α -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы) во все сезоны, исключая зиму, у молоди карася и карпа контрольной группы в 2-3 раза выше, чем у плотвы, и в 30–50 раз выше, чем у окуня (рис. 1), что хорошо согласуется с полученными ранее данными (Уголев, Кузьмина, 1993; Голованова, 2010). При медленном повышении температуры воды со скоростью 0.04°C/ч ферментативная активность у исследованных видов увеличивается во все сезоны года, причем зимой у карася на 50%, у карпа и плотвы лишь на 23–25% от контроля. Летом у всех исследованных видов отмечено последовательное возрастание уровня ферментативной активности с увеличением скорости нагрева воды. При этом максимальная ферментативная активность, отмеченная при скорости 50°C/ч, превышает минимальную у карася в 1.6, у карпа в 1.8, у плотвы в 2.2 раза, в то время как у окуня лишь в 1.2 раза. Осенью наибольшая активность ферментов у всех видов рыб отмечена при скорости нагрева 0.04°C/ч. Максимальное снижение амилолитической активности на 50–60% от контроля выявлено у карпа и карася при скорости нагрева 17°C/ч, у плотвы — на 87% при скорости 4°C/ч, у окуня достоверные изменения отсутствуют. В весенне-зимний период характер изменения ферментативной активности при увеличении скорости нагрева воды у карпа и карася несколько различается. Так, если у карася достоверное снижение амилолитической активности на 30–40% от контроля наблюдается лишь при скоростях нагрева воды 32–50°C/ч, то у карпа — на 25–51% от контроля во всем диапазоне исследованных скоростей нагрева воды (исключая 50°C/ч весной). В то же время у плотвы наибольшее снижение ферментативной активности в зимний и весенний период отмечено при скорости нагрева воды 4°C/ч. Большая устойчивость гликозидаз молоди окуня к действию температуры по сравнению с рыбами сем. Cyprinidae согласуется с данными о меньшем влиянии температуры на гликозидазы хищных рыб, питающихся в течение всего годового цикла, по сравнению с всеядными видами, питание которых прекращается при температуре, ниже 7°C. Так активность α -амилазы у рыб, не питающихся в зимний период при температуре 0°C составляет 10–15%, у питающихся — 50–70% от максимальной активности (Уголев, Кузьмина, 1993).

Амилолитическая активность слизистой оболочки кишечника головешки-ротана *Perccottus glenii* (Dyb) — вида, обладающего повышенной устойчивостью к действию неблагоприятных факторов (Бознак, 2004), также снижается с ростом температуры воды в зимний период. Однако, гликозидазы ротана более устойчивы к высоким скоростям нагрева воды (17 и 44°C/ч) зимой по сравнению с одноименными ферментами рыб сем. Cyprinidae (Голованова и др., 2009).

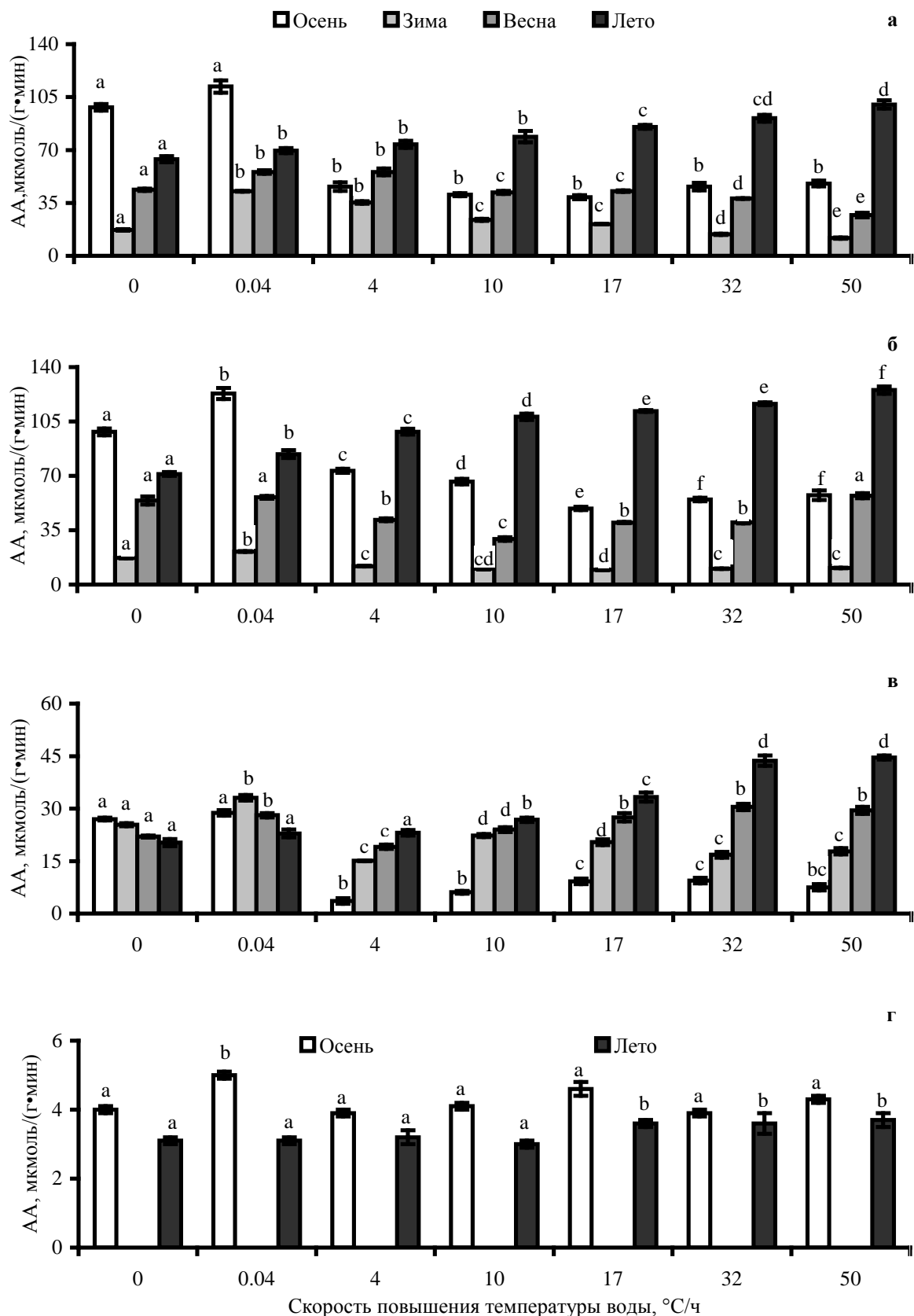


Рис. 1. Амилолитическая активность (АА) в кишечнике молоди рыб при разных скоростях нагрева воды (0, 0.04, 4, 10, 17, 32 и 50°С/ч) в разные сезоны (осень, зима, весна, лето) у карася (а), карпа (б), плотвы (в), окуня (г). Данные представлены в виде средних значений и их ошибки (n=6) в микромолях продуктов реакции, образующихся в 1 мин инкубации на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/(г·мин)). Разные латинские буквы указывают на статистически значимые различия показателей при разной скорости нагрева воды в течение каждого сезона (ANOVA, *LSD*-test). (По: Golovanova et al., 2013).

Кроме того, продемонстрировано разное влияние повышения температуры окружающей среды на активность панкреатических (α -амилаза) и собственно мембранных (сахаразы) гликозидаз (Голованова и др., 2005, 2009). Так, у карася в зимний период при низких скоростях нагрева воды ($0.04^\circ\text{C}/\text{ч}$) амилалитическая активность повышается на 151%, активность α -амилазы — на 382%, в то время как активность сахаразы уменьшается на 89% от контроля (рис. 2). Аналогичная направленность изменений активности гликозидаз выявлена и у карпа.

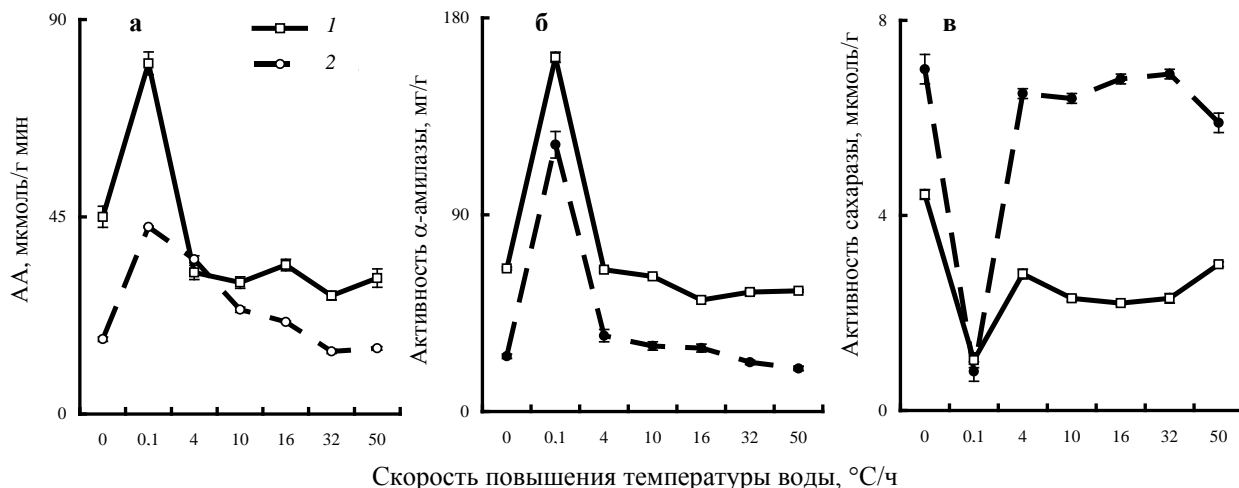


Рис. 2. Амилалитическая активность, АА (а), активность α -амилазы (б) и активность сахаразы (в) в кишечнике молоди карпа (1) и карася (2) при разных скоростях нагрева воды (0, 0.01, 4, 10, 16, 32 и $50^\circ\text{C}/\text{ч}$) в зимний сезон. Данные представлены в виде средних значений и их ошибки, ($n=6$).

В то же время у ротана повышение температуры воды в зимний период со скоростью 4 и $10^\circ\text{C}/\text{ч}$ снижает амилалитическую активность и активность сахаразы в 1.5 раза, однако при самой высокой скорости нагрева воды ($44^\circ\text{C}/\text{ч}$) активность сахаразы растет (табл. 1). Различия в величине и направленности эффекта, по всей вероятности, могут быть обусловлены большей адаптационной пластичностью панкреатической α -амилазы, стоящей в начале ферментативной цепи, по сравнению с собственно кишечными ферментами (глюкоамилазой, мальтазой, сахаразой), локализованными в мембране энтероцитов и осуществляющими промежуточные и заключительные этапы гидролиза углеводов. В то же время, наблюдаемые различия при действии разной скорости повышения температуры воды могут быть обусловлены не только изменением свойств ферментов, гидролизующих крахмал, но и изменением их соотношения.

Таблица 1. Влияние скорости нагрева воды в зимний период на амилалитическую активность и активность сахаразы ($\mu\text{моль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$) в слизистой оболочке кишечника ротана

Показатели	Скорость нагрева воды, $^\circ\text{C}/\text{ч}$				
	0	4	10	17	44
Амилалитическая активность	10.5 ± 0.29^a	7.47 ± 0.13^b	$8.80 \pm 0.15^{b,c}$	$9.44 \pm 1.17^{a,c}$	$9.75 \pm 0.34^{a,c}$
Активность сахаразы	2.24 ± 0.02^a	1.51 ± 0.06^b	1.41 ± 0.08^b	$2.35 \pm 0.05^{a,c}$	2.44 ± 0.03^c

Примечание: приведены средние значения показателя и его ошибка; разные индексы в строке указывают на достоверные статистические различия между вариантами опыта для каждого показателя (ANOVA, LSD-test, $p < 0.05$). (По: Голованова и др., 2009).

Поскольку одной из возможных причин снижения уровня активности пищеварительных гидролаз, отмеченного в зимний, весенний, и особенно в осенний периоды годового цикла при высоких скоростях нагрева воды, может быть прямое повреждающее действие температуры на ферменты, для анализа механизмов наблюдаемых явлений было проведено изучение влияния температуры на скорость гидролиза углеводов в экспериментах *in vitro* (Голованова и др., 2005, 2009; Голованова, 2006).

Так как уровень КТМ не превышал 40°C , исследование влияния температуры *in vitro* на амилалитическую активность кишечника карпа и серебряного карася проводили в температурном диапазоне от 0 до 40°C (Голованова и др., 2005). Уровень амилалитической активности увеличивается с ростом температуры инкубационной среды, однако характер изменения ферментативной активности

существенно различался у рыб контрольной группы и рыб, находившихся в условиях повышения температуры воды (рис. 3).

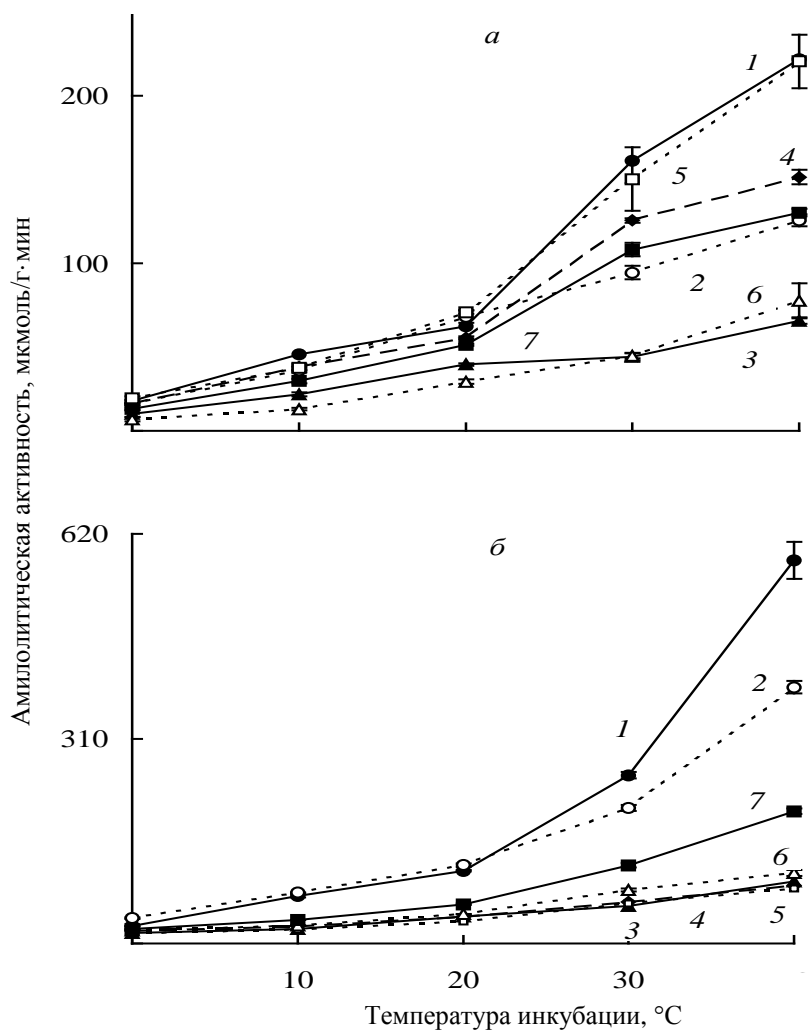


Рис. 3. Влияние температуры инкубационной среды ($^{\circ}\text{C}$) и повышения температуры воды *in vivo* на амилолитическую активность ($\mu\text{кмоль}/(\text{г} \cdot \text{мин})$) в кишечнике карпа (а) и карася (б) в осенний период. Скорость повышения температуры воды: 1 — 0, 2 — 0.1, 3 — 4, 4 — 10, 5 — 16, 6 — 32, 7 — 50 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. (По: Голованова и др., 2005).

Особенно отчетливо эти различия проявились в интервале температуры инкубации 30–40 $^{\circ}\text{C}$. Так, значения коэффициента Q_{10} , позволяющего количественно оценить влияние температуры на скорость реакции, в осенний период у контрольных особей карася составили 2.3, у рыб, содержащихся при увеличении температуры воды со скоростью 0.1 и 50 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ — 1.9 и 1.7 соответственно. Значительное снижение величины этого показателя при увеличении уровня тепловой нагрузки осенью может свидетельствовать о более сильном повреждающем действии высоких скоростей нагрева воды на активность пищеварительных ферментов в этот период. Кроме того, изучение влияния температуры в экспериментах *in vitro* на амилолитическую активность слизистой оболочки кишечника серебряного карася в летний период позволило выявить смещение температурного оптимума с 60 $^{\circ}\text{C}$ у рыб контрольной группы до 30 $^{\circ}\text{C}$ у рыб, содержащихся при скорости нагрева воды 50 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, свидетельствующее об уменьшении термостабильности ферментов при резком повышении температуры среды (рис. 4). При этом также отмечено увеличение относительной активности ферментов в зоне физиологических значений температуры при нагреве воды со скоростью 50 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$.

При изучении амилолитической активности кишечника ротана *in vitro* в диапазоне температуры инкубации от 0 до 70 $^{\circ}\text{C}$ (рис. 5) установлено, что температурный оптимум гидролиза крахмала у рыб контрольной группы равен 50 $^{\circ}\text{C}$ (Голованова и др., 2009). Температурный оптимум гидролиза крахмала у рыб, содержащихся при повышении температуры воды со скоростью 44 $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, также отмечен при 50 $^{\circ}\text{C}$. Дальнейшее повышение температуры инкубационной среды с 50 до 70 $^{\circ}\text{C}$ снижает амилолитическую

активность у опытных рыб в 2.1, у контрольных — лишь в 1.7 раза, свидетельствуя о меньшей устойчивости гликозидаз рыб опытной группы к температурной денатурации белка.

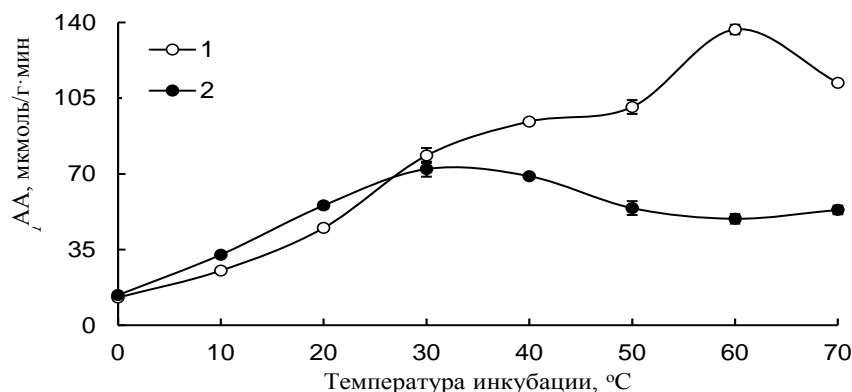


Рис. 4. Влияние температуры инкубационной среды (°C) на амилолитическую активность, АА (мкмоль/(г·мин)) в кишечнике карася в летний период при скорости нагрева воды *in vivo* 4°C/ч (1) и 50°C/ч (2), (n = 6). (По: Голованова, 2006).

Кроме того, величина температурного коэффициента Q_{10} в интервале физиологических значений температуры 10–20°C снижается от 2.3 у контрольных рыб до 1.7 у опытных ($p \leq 0.05$), что согласуется с данными, полученными на молоди карповых видов рыб (Голованова и др., 2005) и свидетельствует о снижении термостабильности ферментов при резком повышении температуры воды в зимний период.

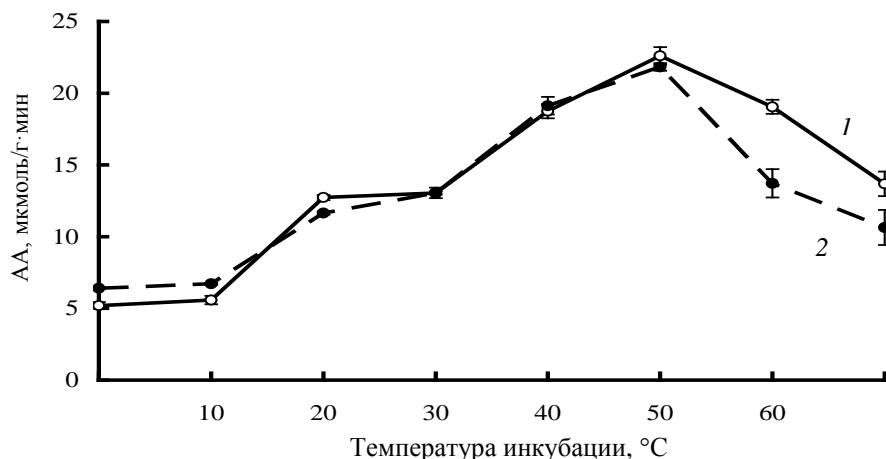


Рис. 5. Влияние температуры инкубационной среды (°C) *in vitro* на амилолитическую активность, АА (мкмоль/(г·мин)) слизистой оболочки кишечника ротана контрольной (1) и опытной (2) групп. (По: Голованова и др., 2009).

Хорошо известно, что при изменении температуры среды обитания адаптации пищеварительной системы животных реализуются главным образом благодаря перестройкам ферментных систем и липидного матрикса мембран (Уголев, Кузьмина, 1993). Активность гликозидаз, локализованных на мембране энтероцитов, в значительной мере зависит от жирнокислотного состава липидного матрикса мембран. Летом преобладают насыщенные жирные кислоты, в то время как зимой увеличивается количество ненасыщенных жирных кислот, позволяющее мембранам поддерживать жидкокристаллическую структуру при низкой температуре (Nochachka, Somero, 1973). Регуляция скорости ферментативных процессов осуществляется преимущественно на клеточном и молекулярном уровне посредством изменения концентрации и свойств ферментов (Nochachka, Somero, 2002). В экспериментах *in vivo* изменение активности пищеварительных гидролаз с ростом температуры окружающей среды может свидетельствовать как об изменении интенсивности синтеза соответствующих ферментов, так и условий их функционирования. Ранее было показано, что зимой при акклимации сеголетков карпа к высокой температуре (35°C) со скоростью 0.04°C/ч амилолитическая активность и активность щелочной фосфатазы увеличиваются в 2–3 раза, активность сахаразы, напротив, достоверно снижается в

2–4 раза, по сравнению с рыбами, акклимированными к 13°C (Кузьмина, Поддубная, 1986). Аналогичное повышение уровня амилолитической активности у серебряного карася, акклимированного к 3°C в зимний период, выявлено в нашей работе при повышении температуры воды со скоростью 0.04°C/ч (Golovanova et al., 2013). Поскольку для синтеза новых пищеварительных ферментов требуется, по крайней мере, несколько суток, а продолжительность резкого температурного воздействия в наших экспериментах не превышала 8.5 ч, снижение активности гликозидаз при скоростях нагрева воды от 4 до 17°C/ч, по всей вероятности, обусловлено изменением свойств ферментов, а не их количества. Кроме того, поскольку амилолитическая активность отражает суммарную активность ферментов, гидролизующих полисахарид крахмал: α -амилазы, глюкоамилазы и мальтазы, наблюдаемые различия при действии разной скорости повышения температуры воды могут быть обусловлены не только изменением свойств указанных ферментов, но и изменением их соотношения.

Температура и тяжелые металлы являются наиболее распространенными экологическими стрессорами и их значение возрастает вследствие глобального изменения климата и антропогенного загрязнения. Экспозиция к химическим веществам может сделать рыб более чувствительными к температурному стрессу, и наоборот, температурный стресс может сделать организм более чувствительным к действию химических веществ. На примере молоди карпа показано, что резкое повышение температуры воды в зимний период со скоростью 50°C/ч увеличивает чувствительность пищеварительных гликозидаз, особенно панкреатической α -амилазы, к негативному действию ионов кадмия, не являющегося необходимым элементом (Голованова, 2004). В присутствии кадмия в концентрации 5–50 мг/л амилолитическая активность и активность α -амилазы достоверно снижаются у карпов как контрольной, так и опытной групп (табл. 3). Максимальное снижение амилолитической активности не превышает 50% у рыб обеих групп, в то время как активность α -амилазы снижается в большей степени у рыб опытной (на 93%), чем контрольной (на 53%) группы.

Таблица 3. Влияние скорости повышения температуры *in vivo* на устойчивость пищеварительных гликозидаз карпа (над чертой) и карася (под чертой) к действию кадмия в зимний период

Скорость повышения температуры, °C/час	Концентрация Cd <i>in vitro</i> , мг/л				
	0	0.5	5	25	50
Амилолитическая активность, мкмоль/(г·мин)					
0	<u>44.5 ± 1.4</u>	<u>41.7 ± 2.0</u>	<u>30.9 ± 1.2**</u>	<u>27.7 ± 1.4**</u>	<u>22.6 ± 1.6**</u>
	15.8 ± 1.1	14.1 ± 0.2	13.7 ± 0.2	13.4 ± 0.3	11.9 ± 0.04*
50	<u>30.3 ± 0.5</u>	<u>28.6 ± 1.0</u>	<u>25.5 ± 1.3**</u>	<u>21.1 ± 0.3**</u>	<u>15.1 ± 0.3**</u>
	12.0 ± 0.3	11.4 ± 0.4	11.2 ± 0.4	10.5 ± 0.5**	9.2 ± 0.3***
Активность сахаразы, мкмоль/(г·мин)					
0	<u>4.0 ± 0.1</u>	<u>3.9 ± 0.1</u>	<u>3.8 ± 0.1</u>	<u>3.8 ± 0.1</u>	<u>3.7 ± 0.1*</u>
	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.0	4.4 ± 0.0
50	<u>2.7 ± 0.1</u>	<u>2.7 ± 0.1</u>	<u>2.5 ± 0.1</u>	<u>2.4 ± 0.1***</u>	<u>2.2 ± 0.1***</u>
	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1*
Активность α -амилазы, мг/(г·мин)					
0	<u>39.6 ± 0.4</u>	<u>36.3 ± 0.4</u>	<u>35.1 ± 0.7**</u>	<u>29.4 ± 1.4**</u>	<u>18.8 ± 1.8**</u>
	–	–	–	–	–
50	<u>31.0 ± 1.4</u>	<u>29.8 ± 0.4</u>	<u>25.3 ± 1.1**</u>	<u>13.1 ± 1.0**</u>	<u>2.0 ± 0.7**</u>
	–	–	–	–	–

Примечание: приведены средние значения показателя и его ошибка (n = 12); различия показателей в строке достоверны по сравнению с контролем (0 мг Cd/л) при: * — p ≤ 0.05, ** — p ≤ 0.01, *** — p ≤ 0.001 (ANOVA, LSD-test). (–) — данные отсутствуют. (По: Голованова, 2004).

Активность сахаразы снижается лишь у рыб опытной группы: у карпа на 12 и 20% при концентрации кадмия 25 и 50 мг/л, у карася — на 40% при 50 мг/л кадмия. Амилолитическая активность в кишечнике карася снижается на 24% при 50 мг/л кадмия у рыб обеих групп, однако у особей опытной группы и более низкая (25 мг/л) концентрация кадмия вызывает достоверное уменьшение ферментативной активности. При этом в большинстве случаев отмечено статистически значимое (p < 0.01) взаимодействие двух факторов — повышения температуры воды и присутствия кадмия (Голованова, 2004).

Кроме того, высокая скорость нагрева воды может усиливать токсическое действие биогенных

металлов на активность гликозидаз кишечника рыб при нагреве воды в летний период (Голованова Голованов, 2014). Повышение чувствительности ферментов, гидролизующих крахмал, у молоди серебряного карася, карпа, плотвы и окуня к действию ионов меди и цинка в концентрации 0.1–25 мг/л происходит за счет снижения ферментативной активности при более низких концентрациях металлов. Тормозящий эффект ионов меди и цинка, как правило, выше при скорости нагрева 50°C/ч, чем при скорости 4°C/ч. Гликозидазы окуня менее чувствительны к повышению температуры и действию ионов меди по сравнению с ферментами карповых видов рыб.

Изучение кинетических характеристик гидролиза крахмала, осуществляемого гликозидазами, функционирующими в составе слизистой оболочки кишечника карася, свидетельствует об отсутствии адаптивных изменений сродства ферментов к субстрату при увеличении тепловой нагрузки (Голованова и др., 2004). Действительно, величины константы Михаэлиса (K_m), характеризующей сродство фермента к субстрату, при скоростях нагрева воды 4 и 44°C/ч оказались близки — 1.3 и 1.5 г/л, соответственно. Ранее при изучении кинетики гидролиза крахмала у ряда видов пресноводных рыб также было показано отсутствие адаптивных изменений этого параметра: значения кажущейся K_m во все сезоны года при температуре 0°C были выше (сродство фермента к субстрату ниже), чем при 20°C (Уголев, Кузьмина, 1993).

В опытах *in vitro* выявлено снижение термостабильности ферментов и их устойчивости к действию тяжелых металлов при увеличении тепловой нагрузки в летний период (Голованова и др., 2004). Так, в присутствии меди и цинка температурный оптимум амилолитической активности при скорости повышения температуры воды 4°C/ч равен 60°C (рис. 6). Более высокий уровень тепловой нагрузки выявил различия в характере зависимости активности гликозидаз от температуры инкубации в присутствии меди по сравнению с контролем, наиболее ярко проявляющиеся в диапазоне температуры 20–40°C, а также наличие двух равных по величине оптимумов (30 и 60°C) в присутствии цинка. Последнее может быть связано как с разной степенью стабилизации различных ферментов (α -амилазы, глюкоамилазы и ферментов группы мальтаз) в суммарных пробах гомогената, так и наличием разных изоформ указанных ферментов.

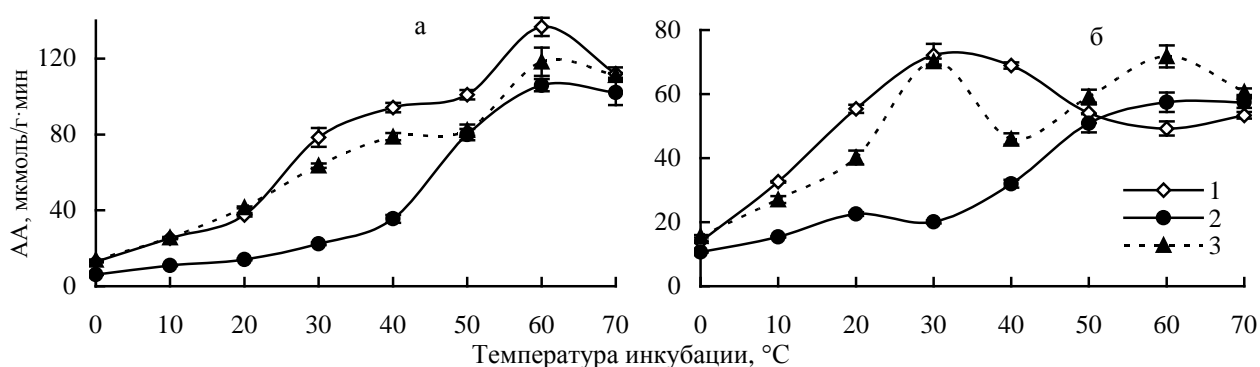


Рис. 6. Влияние температуры инкубационной среды на амилолитическую активность, АА (мкмоль/(г·мин)) в кишечнике карася при скорости нагрева воды 4 (а) и 44°C/час (б). 1 — контроль, 2 — медь (25 мг/л), 3 — цинк (25 мг/л). (По: Голованова и др., 2004).

Таким образом, проведенный анализ продемонстрировал зависимость интенсивности гидролиза углеводов в кишечнике рыб от скорости повышения температуры водной среды. При низких скоростях нагрева около 1°C/сут. рыбы в течение 2–4 недель могут акклиматизироваться к постепенному повышению температуры, и активность гликозидаз (амилолитическая активность, α -амилаза), а, следовательно, и скорость начальных этапов ассимиляции углеводов, увеличивается во все сезоны года. Более высокие скорости нагрева воды 4–50°C/ч повышают амилолитическую активность летом и, как правило, снижают ее в 2–7.5 раз в другие сезоны года. Резкое повышение температуры окружающей среды в осенне-зимний период, когда рост температуры среды противоречит сезонному ходу событий, не позволяет организму приспособиться к быстро меняющимся условиям и уровень амилолитической активности, активности α -амилазы и сахаразы в кишечнике рыб снижаются, негативно влияя на эффективность переваривания углеводных компонентов пищи. Несмотря на повышение активности пищеварительных гликозидаз при увеличении тепловой нагрузки в летний период снижение термостабильности ферментов и их устойчивости к действию тяжелых металлов, выявленное в опытах *in vitro*, может негативно сказаться на интенсивности пищеварения. Поскольку углеводы играют важную роль в энергетическом и пластическом обмене организма, приведенные материалы позволяют прогнозировать последствия

теплового и химического загрязнения водоемов на гидролиз углеводных компонентов корма и углеводный обмен у рыб при разной скорости повышения температуры окружающей среды.

Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН “Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий” и Программ Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-719.2012.4 и НШ-2666.2014.4 “Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бретт Дж. Р. Факторы среды и рост // Биоэнергетика и рост рыб. М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1983. С. 275–346. Brett Dzh. R. Faktory sredy i rost // Biojenergetika i rost ryb. M.: Legkaja i pishch. prom-st', 1983. S. 275–346. [Brett J.R. Environmental factors and growth // Fish physiology. V. VIII. Bioenergetics and growth / W.S. Hoar, D.J. Randall, J.R. Brett (Eds.). New York: Academic Press, 1979. P. 599–675.] In Russian.
- Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. Москва: Полиграф-Плюс, 2013а. 300 с. Golovanov V. K. Temperaturnye kriterii zhiznedeiateľnosti presnovodnykh ryb. Moscow, Poligraf-Plius Publ., 2013a. 300 s. [Golovanov V.K. Temperature criteria of the life activity of freshwater fish / Golovanov V.K.; IBIW RAS. Moscow: POLIGRAF-PLUS, 2013a. 300 p.] In Russian
- Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // Вопр. ихтиологии. 2013б. Т. 53, № 3. С. 286–314. Golovanov V. K. Ekologo-fiziologicheskie zakonomernosti raspredeleniya i povedeniya presnovodnykh ryb v termogradientnykh usloviyakh. Voprosy ikhtiologii, 2013b. T. 53. № 3. S. 286–314. [Golovanov V.K. Ecophysiological patterns of distribution and behavior of freshwater fish in thermal gradients // J. Ichthyol. 2013b. Vol. 53. № 4. P. 252–280. DOI: 10.1134/S0032945213030016].
- Голованов В.К., Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Головкина Е.И., Некрутов Н.С. Динамика активности ацетилхолинэстеразы и водорастворимых белков в головном мозге рыб при разных скоростях нагрева в летний сезон года // Тр. Карел. НЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2015. № 12. С. 116–123. Golovanov V.K., Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Golovkina E.I., Nekrutov N.S. Dinamika aktivnosti atsetilkholinesterazy i vodorastvorimyykh belkov v golovnom mozge ryb pri raznykh skorostyakh nagreva v letnii sezon goda // Trudy Karel. NC RAN. Ser. Eksperim. biologiya. 2015. № 12. S. 116–123. [Golovanov V.K., Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Golovkina E.I., Nekrutov N.S. Dynamics of acetylcholinesterase activity and water-soluble proteins in the brain fish at different speeds heating in the summer season of the year // Proceedings Karel. SC RAS. Ser. Experimental biology. 2015. No. 12. P. 116–123. DOI: 10.17076/eb255] In Russian.
- Голованова И.Л. Влияние различных факторов на устойчивость пищеварительных карбогидраз рыб к действию кадмия // Биология внутр. вод. 2004. № 2. С. 76–83. Golovanova I.L. Vliyanie razlichnykh faktorov na ustoichivost' pishchevaritel'nykh karbogidraz ryb k deistviyu kadmiya // Biologiya vnutr. vod. 2004. № 2. S. 76–83. [Golovanova I.L. Influence of various factors on the stability of digestive carbohydrases fish to the action of cadmium // Inland Water Biology. 2004. No. 2. P. 76–83.] In Russian.
- Голованова И.Л. Влияние природных и антропогенных факторов на гидролиз углеводов у рыб и объектов их питания // Дисс. ...докт. биол. наук. СПб, 2006. 256 с. Golovanova I.L. Vliyanie prirodnykh i antropogennykh faktorov na gidroliz uglevodov u ryb i ob'ektov ikh pitaniya // Diss. ...dokt. biol. nauk. SPb. 2006. 256 s. [Golovanova I.L. Influence of natural and anthropogenic factors on the hydrolysis of carbohydrates in fish and their food objects // Diss. ... doctor. biol. sciences. St. Petersburg, 2006. 256 p.] In Russian.
- Голованова И.Л. Влияние биогенных металлов (Cu, Zn) на активность карбогидраз молоди рыб // Биология внутр. вод. 2010. № 1. С. 98–103. [Golovanova I.L. Influence of biogenic metals (Cu, Zn) on the activity of carbohydrases in juvenile fish *in vitro* // Inland Water Biology. 2010. Vol. 3. No. 1. P. 90–95. DOI: 10.1134/S1995082910010128]. In Russian.
- Голованова И.Л., Голованов В.К. Влияние скорости повышения температуры воды на чувствительность пищеварительных гликозидаз рыб к действию меди и цинка // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2014. Т. 50. № 1. С. 25–30. [Golovanova I. L., Golovanov V. K. Effect of rate of increase of water temperature on sensitivity of fish digestive glycosidases to action of copper and zinc // J. Evol. Biochem. Physiol. 2014. Vol. 50. No. 1. P. 27–33. DOI: 10.1134/S0022093014010046]. In Russian.
- Голованова И.Л., Кузьмина В.В., Голованов В.К. Воздействие высоких температур на пищеварительные гидролазы серебряного карася *Carassius carassius* L. // Вопр. ихтиологии. 2002. Т. 42. № 1. С. 121–128. [Golovanova I.L., Kuzmina V.V., Golovanov V.K. Influence of high temperatures on the digestive hydrolases of goldfish *Carassius auratus* // J. Ichthyol. 2002. Vol. 42. № 1. P. 116–123. DOI: 10.13140/RG.2.1.4080.4966]. In Russian.
- Голованова И.Л., Смирнов А.К., Голованов В.К. Влияние повышения температур воды в осенне-зимний период на активность карбогидраз молоди карповых рыб (сем. Cyprinidae) // Биология внутр. вод. 2005. № 3. С. 87–90. [Golovanova I.L., Smirnov A.K., Golovanov V.K. Influence of the rise in water temperatures in autumn and winter on carbohydrase activity in young fish of the family Cyprinidae // Inland Water Biology. 2005. Vol. 2. P. 87–90.] In Russian.
- Голованова И.Л., Смирнов А.К., Шляпкин И.В. Влияние температуры на активность пищеварительных карбогидраз ротана *Perccottus glenii* Дуб. в зимний период // Биология внутр. вод. 2009. № 2. С. 106–108. [Golovanova I.L., Smirnov A.K., Shlyapkin I.V. The influence of temperature on the activities of digestive carbohydrases in Amur sleeper (*Perccottus glenii* Dyb.) during the winter // Inland Water Biology. 2009. Vol. 2. No. 2. P. 187–189. DOI: 10.1134/S1995082909020126.] In Russian.

- Изменения климата и их последствия. СПб.: Наука, 2002. 269 с. *Izmeneniya klimata i ih posledstviya*. SPb.: Nauka, 2002. 269 s. [Climate change and its consequences. SPb., Science, 2002. 269 p.] In Russian.
- Кляшторин Л.Б., Любушин А.А. Циклические изменения климата и рыбопродуктивности. М.: Изд-во ВНИРО, 2005. 235 с. *Klyashtorin L.B., Ljubushin A.A. Tsiklicheskie izmeneniya klimata i ryboproduktivnosti*. M.: Izd-vo VNIRO, 2005. 235 s. [Klyashtorin L.B., Ljubushin A.A. Cyclic changes of climate and fish productivity. M.: VNIRO Publishing, 2005. 235 p.] In Russian.
- Константинов А.С. Общая гидробиология. М.: Высшая школа, 1972. 472 с. *Konstantinov A.S. Obshchaya gidrobiologiya*. M.: Vysshaya shkola, 1972. 472 s. [Konstantinov A.S. General Hydrobiology. Moscow: High School, 1972. 472 p.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Поддубная Е.А. Уровень активности пищеварительных ферментов карпа при акклимации рыб к высоким температурам // Биология внутр. вод: Информ. бюл. Л., 1986. № 71. С. 35–38. *Kuz'mina V.V., Poddubnaya E.A. Uroven' aktivnosti pishchevaritel'nykh fermentov karpa pri akklimatsii ryb k vysokim temperaturam* // *Biologiya vnutr. vod. Inform. byul. L.*, 1986. № 71. S. 35–38. *Kuz'mina V.V., Poddubnaya E.A. The level of activity of digestive enzymes in the carp under acclimation to high temperatures* // *Inland Water Biology. Inform. Bull.* 1986. No. 71. P. 35–38.] In Russian
- Попова В.В. Современные исследования климата и их региональные особенности на территории России // Антропогенные воздействия на водные ресурсы России и сопредельных государств в конце XX столетия. М.: Наука, 2003. С. 194–218. *Popova V.V. Sovremennye issledovaniya klimata i ikh regional'nye osobennosti na territorii Rossii* // *Antropogennye vozdejstviya na vodnye resursy Rossii i sopredel'nykh gosudarstv v kontse XX stoletiya*. M.: Nauka, 2003. S. 194–218. [Popova V.V. Modern studies of climate and its regional peculiarities in Russia // *Anthropogenic impact on water resources in Russia and neighboring countries in the late twentieth century*. M.: Science, 2003. P. 194–218.] In Russian.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат, 1993. 238 с. *Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. Pishchevaritel'nye protsessy i adaptatsii u ryb*. Spb.: Gidrometeoizdat, 1993. 238 s. [Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. Digestive processes and adaptations in fish. St. Petersburg: Gidrometeoizdat, 1993. 238 p.] In Russian.
- Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. М.: Мир, 1982. Т. I. 416 с. *Shmidt-Niel'sen K. 1982. Fiziologiya zhiivotnyh. Prispособlenie i sreda*. M.: Mir. T. I. 416 s. [Schmidt-Nielsen K. *Animal Physiology. Adaptation and Environment*. Cambridge (U.K.): Cambridge University, 1979. 416 p.]
- Alabaster J.S., Lloyd R. Water quality criteria for freshwater fish. L.: FAO and Butterworth Scientific., 1980. 344 p.
- Beitinger T.L., Bennet W.A., McCauley R.W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // *Environ. Biol. Fish.* 2000. Vol. 58. No. 3. P. 237–275.
- Golovanova I.L., Golovanov V.K., Smirnov A.K., Pavlov D.D. Effect of ambient temperature increase on intestinal mucosa amylolytic activity in freshwater fish // *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39. No. 6. P. 1497–1504.
- Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia London Toronto: W.B. Saunders Company, 1973. 418 p.
- Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution // Oxford-New York: Oxford University Press, 2002. 466 p.
- Hofer R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd, *Scardinius erythrophthalmus* L. I. Amylase // *J. Fish. Biol.* 1979. Vol. 14. No. 6. P. 565–572.

DIGESTIVE GLYCOSIDASE OF FISH UNDER INCREASING WATER TEMPERATURE (REVIEW)

I. L. Golovanova, V. K. Golovanov

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Yaroslavl, Nekouz, Russia, e-mail: golovanova5353@mail.ru*

The effects of the increase of the ambient temperature on the characteristics of glycosidase (enzymes hydrolyzing of carbohydrates) in fish of different ecological groups were studied. The effects of increase in water heating rate on the activity and temperature characteristics of the digestive glycosidases, as well as their sensitivity to heavy metals is revealed. At the lower water heating rate 0.04°C/h fishes during 2–4 weeks are acclimated to gradually raising the temperature and the activity of glycosidase (amylolytic activity, α -amylase) increased in all seasons of the year. Higher heating rates of 4–50°C/h increase of the activity of glycosidase in summer and reduce its 2–7.5 times in other seasons. Rapid increase of ambient temperature in the autumn–winter period, unnatural for seasonal dynamics, does not allow fishes to adapt to rapidly changing of conditions and reduces the effectiveness of the initial stages of assimilation of food. Despite the increase in activity of glycosidase at the all rates of heating water during the summer decrease in thermal stability of enzymes and their resistance to heavy metals can negatively affect the digestive intensity under thermal pollution. Since the temperature and nutritional conditions largely determine the efficiency of fish feeding, the change in digestive function with a gradual or rapid change of ambient temperature possible to predict the effects of global warming, the thermal pollution of water environment, isolation of shallow ponds and fish work related with changes of water temperature.

Key words: fishes, digestion, glycosidase, increasing ambient temperature.

ВЛИЯНИЕ НАКОПЛЕННОЙ РТУТИ НА АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДАЗ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ У ГОЛОВАСТИКОВ СЕРОЙ ЖАБЫ

И. Л. Голованова¹, А. А. Филиппов¹, В. Т. Комов¹, Г. А. Урванцева², Е. Г. Евдокимов²

¹ Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: golovanova5353@mail.ru

² Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
150003, г. Ярославль, ул. Советская, д. 14, e-mail: urvga@mail.ru

В экспериментах *in vivo* проанализировано влияние накопленной в организме ртути (Hg) на активность гликозидаз (мальтаза, амилолитическая активность) в организме головастика серой жабы *Bufo bufo* L. Установлены разнонаправленные изменения активности гликозидаз в зависимости от уровня накопленной Hg и сроков эксперимента. При большем накоплении ртути отмечено снижение активности исследованных гликозидаз и повышение чувствительности ферментов, гидролизующих полисахарид крахмал, к действию ионов тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb).

Ключевые слова: амфибии, серая жаба, гликозидазы, тяжелые металлы.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время практически все водоемы загрязнены тяжелыми металлами, которые в отличие от органических загрязнителей не подвергаются биодеградации, и долгое время не покидают биологический цикл. Они присутствуют в растворимой (или ионной), коллоидной (органической и неорганической) или взвешенной форме. Наибольшей биологической активностью, как правило,обладают ионные формы металлов либо их липофильные комплексы, такие как метилртуть. Ртуть занимает одно из ведущих мест среди тяжелых металлов, оказывающих токсическое действие на живые организмы. Для нее характерна высокая способность к распространению в окружающей среде, биоаккумуляции и миграции по трофическим цепям. Она поступает в атмосферу, как из природных, так и антропогенных источников. Природная эмиссия связана с активностью вулканов, выветриванием горных пород, испарением с поверхности вод мирового океана. Основные антропогенные источники ртути — промышленные предприятия, сжигающие ископаемые виды топлива, предприятия цветной металлургии, производящие цемент, железо и сталь. Масштабы ее антропогенной эмиссии в атмосферу соизмеримы с количествами, участвующими в природном глобальном цикле (Моисеенко и др., 2006). Продолжительность жизни ртути в атмосфере невелика (несколько дней), однако в почве и воде время ее жизни составляет сотни тысяч лет. Мигрируя на большие расстояния и попадая в водоемы, ртуть может представлять угрозу экосистемам и здоровью гидробионтов.

Высокие концентрации ртути (1–3 мг/кг) неоднократно регистрировались в мышцах рыб из водоемов северо-запада России (Комов и др., 2004). Доминирующим фактором в повышении биодоступности ртути при низком ее содержании в абиотических компонентах системы является закисление воды. Попадая с атмосферными осадками в те водоемы, где низкие значения pH создают благоприятные условия для интенсивного протекания процессов метилирования, и, пройдя по трофической цепи, ртуть аккумулируется в тканях гидробионтов в концентрациях, значительно превышающих содержание металла в воде и кормовых организмах. У рыб, экспонированных к сублетальным концентрациям ртути, отмечен целый спектр репродуктивных и физиолого-биохимических нарушений (Voering, 2000; Голованова, 2008; Немова и др., 2014). Ртуть изменяет пищевое поведение рыб, вызывает оксидативный стресс, оказывает мутагенные и тератогенные эффекты. В организм животных она поступает преимущественно с пищей и накапливается в разных тканях и органах в значительных концентрациях. До 95% ртути в тканях гидробионтов, находится в более токсичной метилированной форме. В ряде экспериментов изучено влияние поступающей с пищей ртути на активность гидролаз у беспозвоночных (Голованова и др. 2002) и молоди рыб (Svobodová et al., 1999; Голованова, Комов, 2005; Голованова и др., 2002, 2008; Кузьмина и др., 2013). Кроме того, выявлены разнонаправленные эффекты этого металла на пищеварительные ферменты рыб (Голованова и др., 2012, 2015) и мелких млекопитающих (Голованова и др., 2012а) из природных популяций.

Жаба серая — самая крупная из жаб, обитающих в лесах Европейской части России. Размножение и раннее развитие до стадии метаморфоза проходят в водной среде. Головастики ведут донный образ жизни, роются в иле и поедают растительные остатки и животный корм. Развиваются головастики довольно быстро: на 7–8-й день исчезают наружные жабры, на 22-й появляются почки задних конечностей, на 42-й появляются передние конечности, на 44–45-й начинается резорбция хвоста, и к 50–55 дню они завершают метаморфоз и выходят на сушу. Поскольку значительное количество тя-

желых металлов накапливается в грунтах, а ртуть в них подвергается и бактериальному метилированию с образованием более токсичной формы — метилртути, головастики серой жабы могут накапливать значительное количество металлов непосредственно с кормом. Известно, что присутствие одних металлов может изменять чувствительность организма к действию других (Голованова, 2008). Однако действие ртути на активность гликозидаз — ферментов, гидролизующих углеводы, и влияние содержания ртути на чувствительность этих ферментов к действию ионов тяжелых металлов в тканях головастиков серой жабы исследовано крайне слабо (Евдокимов, 2015).

Цель работы состояла в изучении влияния накопленной ртути (Hg) на активность гликозидаз и их чувствительность к действию ионов тяжелых металлов — меди (Cu), цинка (Zn), свинца (Pb) и кадмия (Cd), в организме головастиков серой жабы *Bufo bufo* L.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили головастики серой жабы, отловленные 2 июня 2015 г сачком в прудах вблизи пос. Борок. (Некоузский район, Ярославской области). В лабораторных условиях головастики содержали в двух пластиковых бассейнах (1 и 2) объемом ~ 500 л с проточной водой при температуре 20°C и постоянной аэрации. В каждый бассейн было помещено по 90 экз. головастиков. Один раз в сутки в каждый бассейн добавляли по 4 г растертого фарша: в 1-ый бассейн вносили фарш из мышечной ткани минтая с содержанием ртути 0.078 мг/кг сырой массы (контрольная группа), во 2-ой — из мышечной ткани окуня с содержанием ртути 0.585 мг/кг сырой массы (опытная группа). Из бассейнов регулярно убирали остатки фарша, чтобы вода оставалась чистой. На 0, 7, 15, 18, 22, и 25-е сутки из каждого бассейна отбирали по 4–10 экз. головастиков для последующего биохимического анализа. Определение ртути в организме головастиков проводили атомно-абсорбционным методом на анализаторе ртути РА–915+ с приставкой ПИРО–915+ с использованием программного обеспечения RA915P.

Для определения активности гликозидаз (мальтаза, амилолитическая активность) готовили суммарные гомогенаты из целого организма головастиков (по 4–25 экз. на каждый вариант эксперимента) при помощи стеклянного гомогенизатора, добавляя охлажденный до 2–4°C раствор Рингера для холоднокровных животных (110 mM NaCl, 1.9 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂. pH 7.4) в соотношении 1:9. Растворы субстратов (1.8%-ный картофельный крахмал и 50 ммоль/л мальтоза) готовили на таком же растворе Рингера. Инкубацию гомогената и субстрата проводили в течение 20–60 мин при температуре 20°C pH 7.4 при непрерывном перемешивании. Амилолитическую активность (отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал — α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) определяли по приросту гексоз методом Нельсона в модификации Уголева, Иезуитовой (1969). Для определения активности мальтазы глюкооксидазным методом применяли набор для клинической биохимии «Фотоглюкоза» (ООО «Импакт», Россия). Активность ферментов определяли в пяти повторностях с учётом фона (количества конечных продуктов реакции в исходном гомогенате) и выражали в микромолях продуктов реакции, образующихся за 1 мин инкубации в расчёте на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/г·мин). Чувствительность гликозидаз к *in vitro* действию ионов меди, цинка, кадмия и свинца изучали, используя растворы сернокислых солей: (CuSO₄ x 5H₂O), (ZnSO₄ x 7H₂O), CdSO₄, и азотнокислого свинца Pb(NO₃)₂. Номинальная концентрация ионов металла в соли составила 25 мг/л. Подобные концентрации ионов данных металлов встречаются в тканях рыб и объектов их питания (Перевозников, Богданова, 1999).

Результаты представлены в виде средних значений и их ошибок (M±m). Достоверность различий оценивали, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, LSD-тест) при p ≤ 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении всего эксперимента содержание металла возрастало в организме головастиков обеих групп (табл. 1). При этом у головастиков опытной группы содержание Hg превышало таковое у особей контрольной группы в 7.4 раза на 7-е, в 1.9 раза на 15-е, в 2.4 раза на 18-е и в 1.7 раза на 22-е сут. Уровень амилолитической активности достоверно не различался у особей контрольной и опытной групп на 7-е сут. В то же время на 15-е сут. отмечено достоверное повышение амилолитической активности на 41%, активности мальтазы — на 26% по сравнению с контрольной группой. Однако на 18-е и 22-е сут. у головастиков опытной группы амилолитическая активность была на 30 и 23% ниже, чем у особей контрольной группы. Достоверное снижение активности мальтазы на 10% у головастиков опытной группы по сравнению с контрольной выявлено лишь на 22-е сут. опыта.

Поскольку на 18-е сут. опыта был накоплен достаточно высокий уровень Hg, а её содержание в тканях головастиков опытной группы в 2.4 раза превышало таковое у особей контрольной группы, бы-

ла предпринята попытка оценить чувствительность гликозидаз *κ in vitro* действию ионов Cu и Zn, являющихся необходимыми микроэлементами, и также ионов Pb и Cd, которые таковыми не являются.

Таблица 1. Активность гликозидаз у головастика серой жабы с разным содержанием ртути

Длительность опыта, сут.	Содержание Hg, мг/кг	Ферментативная активность, мкмоль/(г·мин)	
		Амилолитическая	Мальтаза
0	0.039 ± 0.010	2.49 ± 0.06	0.87 ± 0.01
7	<u>0.016 ± 0.007</u> 0.119 ± 0.007***	<u>1.72 ± 0.02</u> 1.71 ± 0.05	<u>1.51 ± 0.04</u> 1.61 ± 0.04
15	<u>0.057 ± 0.008</u> 0.111 ± 0.007***	<u>1.39±0.06</u> 1.96±0.06***	<u>1.91±0.02</u> 2.40±0.02***
18	<u>0.106 ± 0.007</u> 0.257 ± 0.007***	<u>1.15 ± 0.03</u> 0.81 ± 0.02***	<u>2.13 ± 0.02</u> 2.07 ± 0.02
22	<u>0.140 ± 0.027</u> 0.234 ± 0.027***	<u>0.92 ± 0.04</u> 0.71 ± 0.01*	<u>2.08 ± 0.03</u> 1.88 ± 0.02**

Примечание: приведены среднее значение показателя и его ошибка (n = 10–25); различия показателей достоверны при * — p ≤ 0.05, ** — p ≤ 0.01, *** — p ≤ 0.001 (ANOVA, LSD-test).

Амилолитическая активность у головастика контрольной группы с меньшим содержанием Hg достоверно снижалась на 26% лишь в присутствии ионов Cu (табл. 2).

Таблица 2. Активность гликозидаз у головастика серой жабы с разным содержанием ртути на 18-е сут. опыта в присутствии ионов тяжелых металлов *in vitro*

Содержание Hg, мг/кг	Ионы тяжелых металлов в концентрации 25 мг/л				
	0	Cu	Zn	Pb	Cd
	Амилолитическая активность, мкмоль/(г·мин)				
0.106 ± 0.007	0.88 ± 0.05	0.65 ± 0.03*	0.72 ± 0.04	0.75 ± 0.04	0.80 ± 0.03
0.257 ± 0.007	0.76 ± 0.02	0.57 ± 0.01***	0.68 ± 0.02*	0.55 ± 0.02***	0.58 ± 0.03**
	Активность мальтазы, мкмоль/г·мин				
0.106 ± 0.007	2.12 ± 0.04	1.91 ± 0.04*	2.24 ± 0.10	2.25 ± 0.03	2.19 ± 0.06
0.257 ± 0.007	2.38 ± 0.05	2.48 ± 0.05	2.50 ± 0.04	2.64 ± 0.03*	2.43 ± 0.001

Примечание: приведены среднее значение показателя и его ошибка (n = 10–25); различия показателей в строке достоверны по сравнению с контролем (0 мг/л ионов металла) при * — p ≤ 0.05, ** — p ≤ 0.01, *** — p ≤ 0.001 (ANOVA, LSD-test).

У особой опытной группы с большим содержанием Hg отмечено снижение амилолитической активности на 25, 11, 28 и 24% в присутствии ионов Cu, Zn, Pb и Cd соответственно. Активность мальтазы снижается на 10% в присутствии ионов Cu у головастика контрольной группы, и повышается на 11% в присутствии ионов Pb у особой опытной группы с большим содержанием ртути.

В нашей работе показано, что уровень накопленной Hg порядка 0.1 мг/кг может вызывать повышение активности гликозидаз, в то время как более высокое содержание Hg > 0.2 мг/кг — снижение их активности. Ранее в работе, проведенной в близких экспериментах условиях, также отмечено снижение уровня амилолитической активности и активности мальтазы у головастика серой жабы при накоплении Hg в организме 0.205–0.224 мг/кг (Евдокимов, 2015). Эти изменения были выявлены уже на 8 сут. эксперимента, что может быть связано с большей скоростью накопления Hg в условиях непроточных бассейнов. У головастика травяной лягушки *Rana redibunda* Pallas со стадии выключившихся личинок развивавшихся в присутствии Hg в течение 30 сут. также выявлено снижение амилолитической активности в организме (Голованова и др., 2002). В этом эксперименте особи контрольной группы получали фарш из мышечной ткани окуня с содержанием Hg < 0.02 мг/кг сырой массы, особи опытной группы — фарш из мышц окуня из кислотных озер, содержащий 0.3 мг/кг сырой массы. Головастики содержались в 110-литровых лотках с аэрируемой проточной артезианской водой, в которые вносили 0.3–0.5 г/л фарша 2 раза в неделю. При отдельном содержании амилолитическая активность в целом организме головастика уменьшалась на 50% по сравнению с контролем. При совместном содержании головастика, хирономид и дафний в одном аквариуме уровень и амилолитической, и протеолитической активности у головастика снижался на 67 и 69% соответственно. Ак-

тивность сахаразы в тканях головастиков была на 96% выше, чем у контрольных особей (Голованова и др., 2002).

Повышение активности гликозидаз и сродства ферментов к субстрату с ростом накопления ртути в тканях кишечника было показано ранее на примере бурозубок (содержание Hg 0.03–0.14 мг/кг) и окуня из природных водоемов (Голованова и др., 2012, 2012а). Рост амилолитической активности на фоне снижения сродства ферментов к субстрату был отмечен также в экспериментах на плотве с содержанием Hg 0.03–0.05 мг/кг (Голованова и др., 2008). Возможность увеличения активности пищеварительных ферментов с ростом накопления Hg была продемонстрирована и на примере протеиназы кишечника молоди окуня и карпа, получавших корм с повышенным её содержанием (Голованова и др., 2002; Кузьмина и др., 2013).

На примере молоди карпа было показано, что повышенное содержание ртути в корме (0.3–0.4 мг/кг) снижает не только уровень активности гликозидаз, но и устойчивость α -амилазы, осуществляющей начальные этапы гидролиза углеводов, к действию кадмия, негативно влияя на эффективность начальных этапов ассимиляции углеводов (Голованова, 2004). В нашей работе также выявлено повышение чувствительности ферментов, гидролизующих крахмал, к действию ионов Cu, Zn, Pb и Cd у головастиков с большим содержанием Hg. Чувствительность мальтазы увеличивается лишь в присутствии ионов Pb, и уменьшается в присутствии ионов Cu. Эти данные согласуются с результатами проведенных ранее экспериментов по изучению чувствительности гликозидаз у головастиков серой жабы с разным содержанием Hg в организме к действию ионов Cu и Zn (Евдокимов, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях хронического 22-х сут. эксперимента установлено, что поступление с пищей повышенного количества Hg приводит к её интенсивному накоплению в организме головастиков серой жабы. У особей с большим накоплением Hg отмечены изменения амилолитической активности и активности мальтазы, величина и направленность которых зависит от уровня накопления металла. Содержание Hg около 0.1 мг/кг может вызывать повышение активности гликозидаз, в то время как более высокое её содержание (> 0.2 мг/кг), как правило, приводит к снижению ферментативной активности. Кроме того, повышенное содержание ртути в организме головастиков увеличивает чувствительность ферментов, гидролизующих крахмал, к негативному действию ионов Cu, Zn, Pb и Cd. Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии повышенного содержания ртути в организме головастиков серой жабы на скорость гидролиза углеводов, которое может усиливаться в присутствии ионов других тяжелых металлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голованова И.Л. Влияние повышения температуры воды и содержания ртути в корме на устойчивость пищеварительных карбогидраз карпа к действию тяжелых металлов // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб. Расширен. матер. Всерос. научно-практич. конф. Москва, 2004. С. 287–294. Golovanova I.L. Vliyanie povysheniya temperatury vody i soderzhaniya rtuti v korme na ustoichivost' pishchevaritel'nykh karbohidraz k deystviyu tyazhelykh metallov // Problemy immunologii, patologii i okhrany zdorov'ya ryb. Rasshiren. mater. Vseros. nauchno-praktich. konf. Moskva, 2004. S. 287–294. [Golovanova I.L. Effect of higher water temperatures and the mercury content in the feed to the stability of the digestive carbohydrases of carp to heavy metals // Problems of immunology, pathology and health of fish. Extended. Proc. Scientific-Practical. Conf. Moscow, 2004, P. 287–294.] In Russian.
- Голованова И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биология внутр. вод. 2008. № 1. С. 99–108. [Golovanova I.L. Effects of heavy metals on the physiological and biochemical status of fishes and aquatic Invertebrates // Inland Water Biology. 2008. Vol. 1. No. 1. P. 93–101. DOI: 10.1134/S1995082908010148.] In Russian.
- Голованова И.Л., Комов В.Т. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике речного окуня *Perca fluviatilis* // Вopr. ихтиологии. 2005. Т. 45. № 1. С. 695–701. Golovanova I.L., Komov V.T. Vliyanie rtuti na gidroliz uglevodov v kishhechnike rechnogo okunja *Perca fluviatilis* // Vopr. ikhtiologii. 2005. T. 45. № 1. S. 695–701. [Golovanova I.L., Komov V.T. Influence of mercury on carbohydrate hydrolysis in intestine of European perch *Perca fluviatilis* // J. Ichthyology. 2005. Vol. 45. No. 1. P. 695–701.] In Russian.
- Голованова И.Л., Комов В.Т., Гремячих В.А. Гидролиз углеводов в кишечнике плотвы *Rutilus rutilus* (L.) при различном накоплении ртути в организме // Биология внутр. вод. 2008. № 3. С. 102–108. [Golovanova I.L., Komov V.T., Gremyatchikh V.A. Hydrolysis of carbohydrates in roach (*Rutilus rutilus* L.) at different levels of mercury accumulation // Inland Water Biology. 2008. Vol. 1. No 3. P. 296–302. DOI:10.1134/S1995082908030140.] In Russian.
- Голованова И.Л., Комов В.Т., Кузьмина В.В. Влияние повышенного содержания ртути в корме на активность карбогидраз и протеиназ у различных гидробионтов // Биология внутр. вод. 2002. № 1. С. 85–89. Golovanova I.L., Komov V.T., Kuz'mina V.V. Vliyanie povyshennogo soderzhaniya rtuti v korme na aktivnost' karbohidraz i

- proteinaz u razlichnykh gidrobiontov // *Biologiya vnutr. vod.* 2002. № 1. S. 85–89. [Golovanova I.L., Komov V.T., Kuzmina V.V. Influence of elevated mercury levels in the diet on the activity of carbohydrases and proteases in various hydrobionts // *Inland Water Biology.* 2002. No. 1. P. 85–89.] In Russian.
- Голованова И.Л., Пенькова Г.А., Гремячих В.А., Комов В.Т. Влияние накопленной ртути на активность карбогидраз в кишечнике окуня *Perca fluviatilis* из водоемов Европейской части России с разным уровнем pH воды // *Биология внутр. вод.* 2012. № 1. С. 94–99. Golovanova I.L., Pen'kova G.A., Gremyachikh V.A., Komov V.T. Vliyanie nakoplennoi rtuti na aktivnost' karbogidraz v kishechnike okunya *Perca fluviatilis* iz vodoemov Evropeiskoi chasti Rossii s raznym urovнем pH vody // *Biologiya vnutr. vod.* 2012. № 1. S. 94–99. [Golovanova I. L., Pen'kova G.A., Gremyachikh V.A., Komov V.T. The effect of mercury accumulation on the intestinal glycosidase activity in perch *Perca fluviatilis* L. from water bodies of European Russia with different pH // *Inland Water Biology.* 2012. Vol. 5. No. 1. P. 128–132. DOI: 10.1134/S1995082912010051.] In Russian.
- Голованова И.Л., Пенькова Г.А., Степина Е.С. и др. Влияние ртути на гидролиз углеводов в кишечнике бурозубок // *Токсикол. вестник.* 2012а. № 3. С. 52–56. Golovanova I.L., Pen'kova G.A., Stepina E.S. i dr. Vliyanie rtuti na gidroliz uglevodov v kishechnike burozubok // *Toksikol. vestnik.* 2012а. № 3. S. 52–56. [Golovanova I.L., Pen'kova G.A., Stepina E.S. et al. Effect of mercury on the hydrolysis of carbohydrates in the intestines of shrews // *Toxicology Herald.* 2012а. No. 3. P. 52–56.] In Russian.
- Голованова И.Л., Филиппов А.А., Пенькова Г.А., Комов В.Т. Влияние ртути на переваривание углеводов у рыб разных экологических групп // *Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты. Сб. трудов Второго Международ. симпоз.* 2015. Новосибирск. С. 94–97. Golovanova I.L., Filippov A.A., Pen'kova G.A., Komov V.T. Vliyanie rtuti na perevarivanie uglevodov u ryb raznykh ekologicheskikh grupp // *Rtut' v biosfere: ekologo-geokhimicheskie aspekty. Sb. trudov Vtorogo Mezhdunar. simpoz.* 2015. Novosibirsk. S. 94–97. [Golovanova I.L., Filippov A.A., Pen'kova G.A., Komov V.T. The impact of mercury on the digestion of carbohydrates in fish of different ecological groups // *The mercury in the biosphere: ecological and geochemical aspects. Proceedings of the Second International. Symposium.* 2015. Novosibirsk. P. 94–97.] In Russian.
- Евдокимов Е.Г. Влияние накопленной ртути на активность гликозидаз и их чувствительность к действию ионов меди и цинка у головастиков серой жабы // *Путь в науку: Матер. III Междунар. молодеж. науч.-практич. конф. Ярославль: ЯрГУ, 2015. с. 412–417. Evdokimov E.G. Vliyanie nakoplennoy rtuti na aktivnost' glikozidaz i ikh chuvstvitel'nost' k deistviyu ionov medi i tsinka u golovastikov seroi zhaby // *Put' v nauku: Mater. III Mezhdunar. molodezh. nauch.-praktich. konf. Jaroslavl': JarGU, 2015. S. 412–417. [Evdokimov E.G. The impact of mercury accumulated on the activity of glycosides and their sensitivity to copper and zinc ions in toad tadpoles // *Path in science: Proceed. III International youth. scientific-practical conf. Jaroslavl: Jaroslavl State University, 2015. P. 412–417.] In Russian.***
- Комов В.Т., Степанова И.К., Гремячих В.А. Содержание ртути в мышцах рыб из водоемов Северо-Запада России: причины интенсивного накопления и оценка негативного эффекта на состояние здоровья людей // *Актуальные проблемы водной токсикологии. Борок: Рыбинский Дом печати. 2004. С. 99–123. Komov V. T., Stepanova I.K., Gremyachikh V.A. Soderzhanie rtuti v myshtsah ryb iz vodoemov Severo-Zapada Rossii: prichiny intensivnogo nakopleniya i otsenka negativnogo effekta na sostoyanie zdorov'ya lyudei // *Aktual'nye problemy vodnoi toksikologii. Borok: Rybinskii Dom pečhati. 2004. S. 99–123. [Komov V.T., Stepanova I.K., Gremyachikh V.A. Mercury content in fish muscle from the reservoirs of the North-West of Russia: causes of intensive accumulation and assessment of the adverse effect on health // *Actual problems of aquatic toxicology. Borok: Rybinsk Printing House. 2004. P. 99–123.] In Russian.***
- Кузьмина В.В., Комов В.Т., Гремячих В.А., Русанова П.В. Активность пищеварительных гидролаз карпа *Cyprinus carpio* при разном содержании ртути в корме // *Вопр. ихтиологии.* 2013. Т. 53. № 3. С. 358–366. [Kuz'mina V.V., Komov V.T., Gremyachikh V.A., Rusanova P.V. Activity of digestive hydrolases in carp *Cyprinus carpio* with different mercury content in food // *J. Ichthyology.* 2013. Vol. 53. No. 4. P. 301–309. DOI: 10.1134/S0032945213020082.] In Russian.
- Моисеенко Т.И., Кудрявцева Л.П., Гашкина Н.А. Рассеянные элементы в поверхностных водах суши: Технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология. М.: Наука, 2006. 261 с. Moiseenko T.I., Kudryavtseva L.P., Gashkina N.A. Rasseyannye elementy v poverkhnostnykh vodakh sush: Tekhnofil'nost', bioakkumulyatsiya i ekotoksikologiya. M.: Nauka, 2006. 261 s. [Moiseenko T.I., Kudryavtseva L.P., Gashkina N.A. Trace elements in the surface waters of the land: Technophiliti, bioaccumulation and ecotoxicology. Moscow: Science, 2006. 261 p.] In Russian.
- Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Мещерякова О.В., Комов В.Т. Ртуть в рыбах: биохимическая индикация // *Биосфера.* 2014. Т. 6. С. 176–186. Nemova N.N., Lysenko L.A., Meshcheryakova O.V., Komov V.T. Rtut' v rybakh: biokhimicheskaya indikatsiya // *Biosfera.* 2014. Т. 6. S. 176–186. [Nemova N.N., Lysenko L.A., Meshcheryakova O.V. Komov V.T. Mercury in fish: biochemical indication // *Biosphere.* 2014. Vol. 6. P. 176–186.] In Russian.
- Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. Санкт-Петербург, 1999. 228 с. Perevoznikov M.A., Bogdanova E.A. Tyazhelye metally v presnovodnykh ekosistemakh. Sankt-Peterburg, 1999. 228 s. [Perevoznikov M.A., Bogdanova E.A. Heavy metals in the freshwater ecological systems. Saint-Petersburg, 1999. 228 p.] In Russian.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г. и др. Исследование пищеварительного аппарата у человека. Обзор современных методов. Л.: Наука. 1969. 216 с. Ugolev A.M., Iezuitova N.N., Masevich C.G. i dr. Issledovanie pishchevaritel'nogo apparata u cheloveka. Obzor sovremennykh metodov. L.: Nauka. 1969. 216 s. [Ugolev A.M.,

- Iezuitova N.N., Masevich C. et al. Study of the digestive tract in humans. Review of modern methods. L.: Science. 1969. 216 p.] In Russian.
- Boeing D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review // *Chemosphere*. 2000. Vol. 40. P. 1335–1351.
- Svobodová Z., Dušek L., Hejtmánek M. et al. Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlik and Kamyk water reservoirs in the Czech Republic // *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 1999. Vol. 43. No. 3. P. 231–240.

EFFECT OF MERCURY ACCUMULATION ON THE ACTIVITY OF GLYCOSIDASE AND THEIR SENSITIVITY TO HEAVY METALS IN TOAD TADPOLES

I. L. Golovanova¹, A. A. Filippov¹, V. T. Komov¹, G. A. Urvantseva², E. G. Evdokimov²

¹ *I. D. Papanin Institute of the Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, 152742 Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: golovanova5353@mail.ru*

² *P. G. Demidov Yaroslavl State University*

150003, Yaroslavl, Sovetskaya st., 14, e-mail: urvga@mail.ru

The effects of the mercury (Hg) accumulation on the activity of glycosidases (maltase, amylolytic activity) in whole body of toad tadpoles *Bufo bufo* L. were *in vivo* studied. Multidirectional changes in the activity of glycosidase according to the level of Hg accumulation and duration of the experiment were established. A larger accumulation of Hg decreased activity of investigated glycosidase and the sensitivity of enzymes hydrolyzing of polysaccharide starch to the ions of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb).

Key words: amphibian, toad, glycosidases, heavy metals.

РОЛЬ СЕРОТОНИНА И ХОЛЕЦИСТОКИНИНА В РЕГУЛЯЦИИ ТЕРМОИЗБИРАТЕЛЬНОГО И ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ У РЫБ

Д. В. Гарина, В. В. Кузьмина, А. К. Смирнов, П. В. Меньшакова

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: garinadv@mail.ru*

Физиологические и биохимические аспекты термоизбирательного поведения рыб остаются плохо изученными до настоящего времени, несмотря на значительную актуальность проблемы. Важная роль в центральной терморегуляции принадлежит системам нейромедиаторов: норэпинефрину, серотонину, дофамину, холецистокинину и некоторым другим. Изменение баланса этих веществ в мозге вызывает каскад биохимических реакций, результатом которых является поведенческий ответ и, как следствие, изменение температуры тела животного. Вместе с тем, ключевые нейромедиаторы, к числу которых принадлежат серотонин и холецистокинин, участвуют в регуляции другой формы поведения рыб, направленной на поддержание энергетического гомеостаза — пищевого поведения. В настоящей статье обобщены сведения, полученные авторским коллективом за 5 последних лет работы, касающиеся роли серотонина и холецистокинина в центральной регуляции пищевого и термоизбирательного поведения у пресноводных костистых рыб.

Ключевые слова: рыбы, серотонин, холецистокинин, термоизбирательное и пищевое поведение

ВВЕДЕНИЕ

В естественных условиях среды в водоёмах умеренного климатического пояса рыбам приходится постоянно сталкиваться с резкими перепадами температуры. Термоизбирательное поведение рыб — наиболее быстрый и энергетически выгодный способ избежать повреждающих температур и выбрать наиболее оптимальные для их текущего физиологического состояния (Golovanov et al., 2014). В многолетних исследованиях, проведённых в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина, группой термозкологов подробно изучены возрастные и сезонные изменения избираемой температуры у разных видов рыб (Лапкин и др., 1981; Голованов, 1996; Смирнов, 2013; Golovanov et al., 2014 и др.). Однако физиолого-биохимические аспекты термоизбирательного поведения рыб, в частности, роль нейромедиаторных систем мозга изучены до настоящего времени недостаточно.

Как известно, серотонин и холецистокинин являются одними из ключевых нейромедиаторов, участвующих в регуляции поведенческих реакций и физиологических функций у животных, направленных на поддержание их энергетического гомеостаза (Balaskó et al., 2013; Dockray, 2009; Donovan, Tecott, 2013; Orchard, 2006; Shiraiishi, 1990; Szélenyi, 2010; Tecott, 2007 и др.). В частности, установлено, что введение серотонина или его предшественника триптофана в мозг приводит к снижению потребления пищи позвоночными животными, включая рыб (de Pedro et al., 1998; Fletcher, Burton, 1986; Simansky, 1996; Yamada et al., 2006 и др.). С другой стороны, серотонин является одним из звеньев нейрохимического контроля температуры тела животного, а именно участвует в её понижении при гипоксии. Данный процесс имеет большое адаптивное значение для организма животного, поскольку позволяет сократить энерготраты в виде выделяющегося тепла в условиях нехватки кислорода (Vicego et al., 2007; Branco et al., 2006). Однако необходимо отметить, что до настоящего времени все модели термоизбирательных процессов с участием серотонина предложены для теплокровных животных (Vicego et al., 2007), тогда как данные, касающиеся терморегуляции у холоднокровных, носят фрагментарный характер. Известно, что серотонинергическая система мозга рыб чувствительна к термальному стрессу. В частности, повышение температуры акклимации на 5–6°C по сравнению с оптимумом приводит к увеличению содержания метаболита серотонина 5-гидроксииндолуксусной кислоты (de Voeck et al., 1996) и снижению содержания серотонина (Tsai, Wang, 1997). Микроинъекция серотонина в гипоталамус тилапии приводила к значительному увеличению избираемых рыбами температур (до 7°C) в течение нескольких часов после инъекции (Tsai et al., 2002). Существенным, на наш взгляд, недостатком данных исследований, направленных на выяснение роли серотонина в регуляции избираемых температур, является их краткосрочность, поскольку было показано, что выбор рыбами оптимальных для жизнедеятельности температур за столь короткое время (несколько часов) невозможен (Лапкин и др., 1981).

Также, как и серотонин, холецистокинин является кишечным гормоном и одновременно регуляторным нейропептидом, обильно представленным в ЦНС животных. Выявлена высокая концентрация ХЦК₈ (Beinfeld, Palkovits, 1981) и его рецепторов (Day et al., 1986) в гипоталамусе высших позвоночных животных — главном интегративном центре, выполняющем функции регуляции энергетического и пластического обмена веществ, интенсивности питания и терморегуляции. Установлено, что

увеличение концентрации ХЦК в гипоталамусе приводит к снижению потребления пищи у рыб (Himick, Peter, 1993). Позднее было подтверждено, что в мозгу рыб ХЦК функционирует преимущественно как сигнал сытости (Murashita et al., 2009; Peyon et al., 1999; Rubio et al., 2008; Thavanathan, Volkoff, 2006; Penney, Volkoff, 2014). Относительно роли холецистокинина в центральной терморегуляции у рыб в доступной нам литературе не найдено никаких сведений. В то же время, при изучении влияния ХЦК на терморегуляционное поведение млекопитающих было выявлено два типа эффектов: гипертермия (лихорадка) и гипотермия. У крыс центральные микроинъекции ХЦК, как правило, вызывают увеличение температуры тела, данный эффект может быть ослаблен введением антагонистов центральных рецепторов холецистокинина типа В, но не введением антагониста периферических рецепторов типа А. Напротив, введение антагониста рецепторов типа А значительно снижает гипотермический эффект, вызванный периферической инъекцией холецистокинина, но не влияет на гипертермический эффект, вызванный центральной инъекцией пептида. Однако, по мнению авторов, эти различия могут быть обусловлены не только набором рецепторов (Szelényi et al., 2004). Следует отметить, что работ, исследующих влияние серотонина и холецистокинина сразу на две формы поведения рыб, ответственные за поддержание энергетического баланса организма — пищевое и терморегуляционное, в условиях неоднородной по температуре среды ранее не проводилось.

Таким образом, целью настоящей работы, учитывая имеющиеся в литературе сведения, их фрагментарность и полное отсутствие по ряду вопросов, касающихся участия серотонина и холецистокинина в регуляции энергетического гомеостаза у рыб, было:

1. установить роль серотонина в регуляции температурного оптимума у рыб в длительных (до 10 сут.) экспериментах;
2. установить роль холецистокинина в регуляции температурного оптимума у рыб в длительных (до 10 сут.) экспериментах;
3. исследовать влияние серотонина и холецистокинина на пищевое и термоизбирательное поведение рыб в условиях температурной неоднородности среды, моделируемой в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эффекты серотонина и холецистокинина на термоизбирательное и пищевое поведение костистых рыб (в условиях температурной неоднородности среды) были изучены в 9 сериях экспериментов. Для исследования роли серотонина в регуляции термопреферендума рыб использовались два подхода: скармливание рыбам корма, содержащего флуоксетин (антидепрессант из группы ингибиторов обратного захвата серотонина, увеличивающий содержание серотонина в синапсах нейронов головного мозга), и внутримозговое (в область 4-го желудочка) введение серотонина. Исследование влияния флуоксетина на среднесуточную избираемую и окончательную избираемую температуры проводили в двух сериях экспериментов: в июне–июле и августе–сентябре 2010 г. на молоди плотвы (*серии 1 и 2*). Опыты по влиянию внутримозгового введения серотонина на те же показатели были проведены в феврале 2012 г. (молодь карпа) и в январе–феврале 2013 г. (молодь карася серебряного) (*серии 3 и 4*). После установления эффектов серотонина на температурный оптимум у рыб было исследовано влияние нейромедиатора на их пищевую активность в термоградиентной среде, когда перед рыбами стояло одновременно две задачи: выбрать оптимальную температуру и съесть необходимое для поддержания энергетического баланса количество корма. С этой целью было проведено два эксперимента: в апреле 2013 г. и в феврале 2014 г. на молоди карпа (*серии 5 и 6*). Эффекты холецистокинина на среднесуточную избираемую и окончательную избираемую температуры были изучены в двух сериях экспериментов: в сентябре 2014 г. и июле 2015 г. на молоди серебряного карася (*серии 7 и 8*). Исследование влияния холецистокинина на пищевое поведение серебряного карася в термоградиентной среде проводили в августе 2015 г. (*серия 9*).

Объекты исследования

В экспериментах была использована молодь трёх видов рыб семейства карповых: плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) (*серии 1 и 2*), карпа *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (*серии 3, 5 и 6*) и серебряного карася *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) (*серии 4, 7–9*). Молодь плотвы была получена в результате искусственного нереста производителей, молодь карпа и карася — естественным нерестом. В течение летнего периода личинки и мальки подращивались в прудах экспериментальной прудовой базы ИБВВ РАН «Сунога», в сентябре молодь была привезена и акклиматизирована к лабораторным условиям. До начала экспериментов молодь содержали в непроточных аквариумах объёмом 200 л с принудительной аэрацией. Температура воды 18–20°C, освещение естественное. Рыб кормили один раз в сутки искусственным желированным кормом. Состав корма: белки — 17,3, жиры — 1,7 и углеводы — 0,1% в расчете на сырую массу. На момент начала экспериментов возраст, средняя масса

и средняя длина молоди составляли соответственно: плотва — 11–12 мес., 2,6–3,9 г, 71–75 мм; карп — 8–10 мес., 5,7–10,3 г, 61–90 мм; серебряный карась — 0+ и 1+, 5,3–15,0 г, 54–83 мм.

Методика проведения экспериментов

Подготовка к эксперименту. Перед началом всех экспериментов было сформировано две группы рыб: опытная и контрольная, по 10 (*серии 1–4*) и 5 (*5–9*) особей в каждой. Как опытная, так и контрольная группы рыб подвергались предварительной акклимации в течение 7–14 сут. к температуре 18–19°C (в большинстве опытов), что примерно соответствует средней летней температуре воды в Рыбинском водохранилище. Во 2-й серии экспериментов дополнительно исследовали термоизбирательное поведение плотвы после акклимации к повышенной температуре — 28°C. После истечения периода акклимации рыб подвергали процедуре инъекции препаратов (*серии 3–9*).

В 1-й и 2-й сериях опытов через 5 сут. после начала температурной адаптации опытную группу плотвы начинали кормить кормом, содержащим флуоксетин, и кормили им на протяжении периода адаптации и далее на протяжении всего эксперимента. Искусственный корм, содержащий препарат, давали рыбам один раз в сутки из расчёта 7,5% от массы тела. Доза препарата, полученного с кормом, составляла приблизительно 0,3 мкг/г массы тела в сутки. Контрольная группа получала тот же самый корм, но без добавления препарата.

Инъекция препаратов. Введение препаратов в мозг рыб в область 4-го мозгового желудочка производили под наркозом (трикаина метансульфонат (MS-222), 130 мг/л воды) с помощью шприца Гамилтона по апробированной авторами методике (Гарина, Мехтиев, 2014). Анестезированных рыб опытной группы подвергали процедуре микроинъекции (1 мкл) гидрохлорида серотонина (Sigma Aldrich, USA) в дозе 0,3 мкг/г (*серии 3, 5 и 6*) и 0,15 мкг/г массы тела (*серия 4*) или холецистокинина-33 (Sigma Aldrich, USA) в дозах 1 (*серия 7*) и 6 нг/г массы тела (*серии 8 и 9*). Контрольной группе рыб вводили то же количество раствора Рингера для холоднокровных животных (рН 7,4). В 4-й серии опытов в качестве контрольной была группа интактных рыб, которая не подвергалась инъекции. Все инъецированные рыбы выжили и полностью восстановили нормальное поведение. Сразу после инъекции препаратов рыб, восстановивших подвижность после наркоза, помещали в отсек термоградиентной установки с температурой, соответствующей температуре акклимации.

Экспериментальная установка. Для исследования среднесуточной и окончательной избираемой температур были использованы одноканальная (*серии 1 и 2*) и двухканальная (*серии 3–9*) термоградиентные установки. Исследование пищевой активности рыб под воздействием серотонина и холецистокинина в условиях температурной неоднородности среды проводилось в двухканальной установке. Одноканальная установка представляла из себя стеклянный горизонтальный лоток (320 × 23 × 17 см), разделённый неполными перегородками на 12 камер, в каждой из которых у дна размещались два аэратора для устранения вертикальной стратификации (Голованов и др., 2012). Двухканальная установка состояла из двух стеклянных лотков, каждый длиной 580 см, шириной 36 см и высотой 17 см, разделённых неполными перегородками на 11 отсеков. Температурный градиент составлял 15°C: от 15 до 30°C — в одноканальной установке и от 20°C до 35°C — в двухканальной установке. Световой режим устанавливался в соотношении 12:12. Температура измерялась с помощью электронных термометров с подключенными цифровыми термодатчиками, расположенными по центру каждого отсека.

Распределение рыб в температурном градиенте фиксировали в светлое время суток с помощью видеокамеры. В течение дня производили 15 видеонаблюдений распределения рыб в отсеках термоградиентной установки, в опытах по исследованию пищевой активности (*серии 5, 6 и 9*) одну видеорегистрацию поведения рыб производили во время их кормления. Данные видеозаписи поведения рыб обрабатывали на компьютере. По результатам анализа видеозаписи, устанавливали среднесуточную и окончательную избираемые температуры, в сериях 5, 6 и 9 дополнительно — количество съеденного рыбами корма, в каждом отсеке и в целой установке.

В опытах по исследованию влияния серотонина и холецистокинина на пищевую активность рыб в неоднородной по температуре среде рыб кормили один раз в сутки (в 11 ч) личинками хирономид. Личинок помещали на 11 круглых кормовых ситечек, в каждый отсек установки помещали одно ситечко с кормом. Время нахождения корма в установке составляло 15 мин, после чего ситечки изымались и подсчитывались несъеденные личинки. В 5-й серии опытов карпы получали в качестве корма мелких хирономид (масса 5,5 мг) в количестве 60 экз. на «пятно», в 6-й серии — крупных хирономид (масса 32 мг) в количестве 25 экз. на «пятно», что составляло 1,0 и 2,5% от массы тела рыб соответственно. В 9-й серии карасы получали хирономид (масса 15 мг) в количестве 50 экз. на «пятно», что составляло примерно 1,7% от массы тела рыб в каждом отсеке установки. После окончания кормления и подсчёта съеденного корма остатки корма скармливали рыбам. В конце эксперимента, на 11-й день рыб изымали из установки, измеряли и взвешивали.

Статистическую обработку данных выполняли в программе STATISTICA 6.0. Достоверность межгрупповой разности средних значений избираемых температур и количества съеденного корма оценивали с использованием *t*-критерия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние серотонинотропного препарата флуоксетина на выбор молодью плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) температурного оптимума

Показано, что эффекты флуоксетина на термоизбирательное поведение плотвы в 1-й и 2-й сериях экспериментов несколько отличались и, по-видимому, зависели от температуры предварительной акклимации рыб. В эксперименте I зафиксировано достоверное увеличение избираемых температур у плотвы опытной группы по сравнению с контролем на 5.2°C ($p < 0.05$) лишь через три часа после посадки рыб, после чего значения среднесуточной избираемой температуры у рыб контрольной группы значительно превышали таковые у плотвы контрольной группы, а в конце эксперимента окончательная избираемая температура не различалась у рыб двух групп (рис. 1).

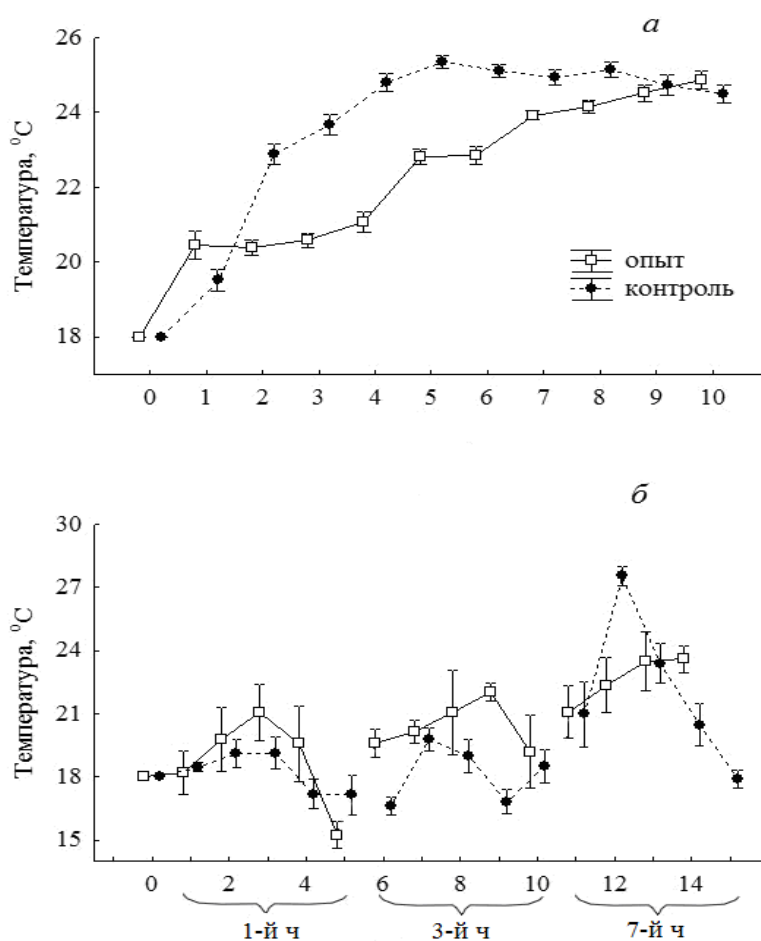


Рис. 1. Динамика значений избираемой температуры ($M \pm m$) у плотвы, адаптированной к 18°C (эксперимент I): а — в течение всего периода наблюдений; б — в течение первых суток эксперимента $M \pm m$ — среднее значение показателя и его ошибка. По оси абсцисс: а — время после посадки рыб в термоградиентную установку, сут.; б — порядковый номер наблюдения, фигурной скобкой объединены точки наблюдения, соответствующие 1-му, 3-му и 7-му часу после посадки рыб в термоградиентную установку (по: Гарина, Смирнов, 2012).

Наиболее яркие эффекты флуоксетина на термоизбирательное поведение плотвы были получены нами во втором эксперименте, с предварительной температурой акклимации 28°C : среднесуточная избираемая температура у опытной группы рыб значительно выше таковой у рыб контрольной группы на протяжении всего эксперимента; окончательная избираемая температура у рыб, потреблявших корм с флуоксетином, на 2.3°C выше, чем у рыб, потреблявших обычный корм ($p < 0.05$) (рис. 2).

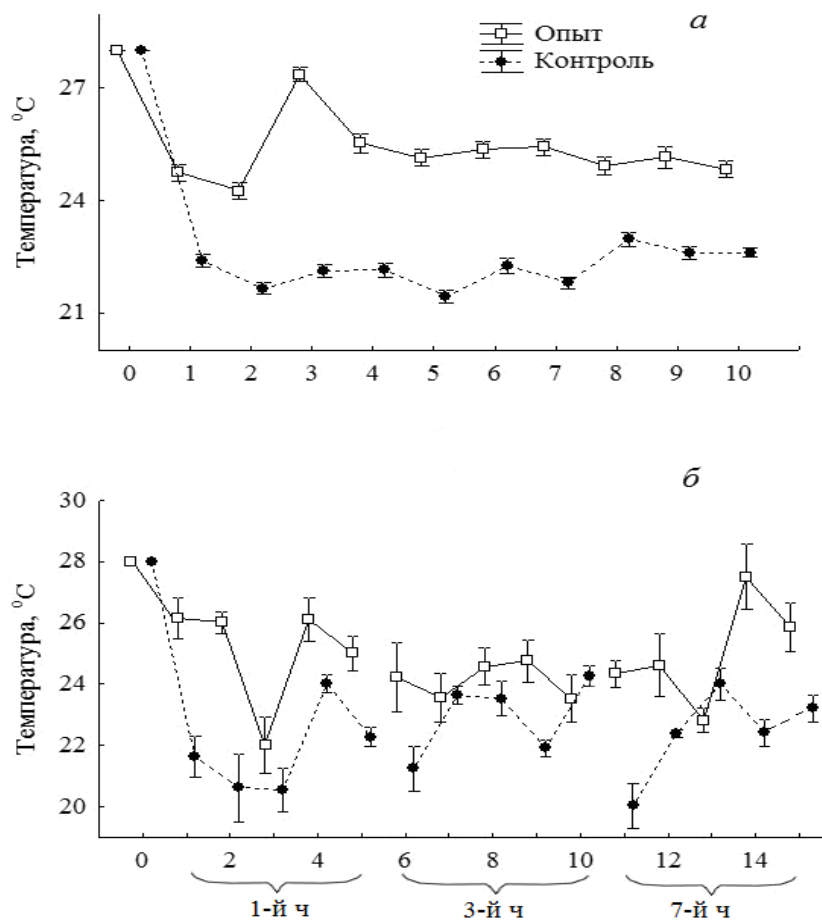


Рис. 2. Динамика значений избираемых температур у плотвы, адаптированной к 28°C (эксперимент II); обозначения см. на рис. 1. (по: Гарина, Смирнов, 2012).

Таким образом, действие флуоксетина, выражающееся в увеличении содержания серотонина в синапсах нейронов головного мозга, согласуется (по данным других авторов) с действием серотонина, введённого в область гипоталамуса рыб (Tsai et al., 2002), т.е. вызывает увеличение избираемых температур: в первом эксперименте — на коротком отрезке наблюдения (в первые сутки после посадки), во втором — на всём протяжении эксперимента. Можно предположить, что более выраженный и длительный эффект серотонина во втором эксперименте обусловлен воздействием высокой температуры предварительной акклимации рыб, и, следовательно, снижением уровня эндогенного серотонина у рыб контрольной группы в результате возросшей активности моноаминоксидазы в тканях (Hall et al., 1982; Tsai, Wang, 1997). На это также указывают сравнительно низкие значения избираемой температуры у особей контрольной группы (почти на 4°C ниже обычной для плотвы данного возраста).

2. Влияние внутримозговых инъекций серотонина на термоизбирательное поведение молоди карпа *Cyprinus carpio Linnaeus, 1758* и серебряного карася *Carassius auratus (Linnaeus, 1758)*

Установлено, что в 3-й серии экспериментов в течение первых суток эксперимента наблюдается резкое возрастание среднесуточной избираемой температуры, как в опытной, так и контрольной группах рыб (рис. 3), что согласуется с данными, полученными на различных видах рыб (Лапкин и др., 1981). Далее со 2-х по 5-е сут. опыта значения показателя у карпов контрольной группы возрастают в более медленном темпе, тогда как в опытной — несколько снижаются на 2-е и 3-е сутки. На 4-е сут. опыта среднесуточные избираемые температуры в опытной группе вновь повышаются и продолжают возрастать вплоть до конца эксперимента, тогда как данный показатель в контрольной группе рыб в этот период стабилизируется и даже несколько снижается. Максимальные различия в значениях избираемых температур были получены на 6, 8 и 9-тые сут. эксперимента и были достоверно выше у карпов опытной группы на 4.1°C ($p < 0.05$).

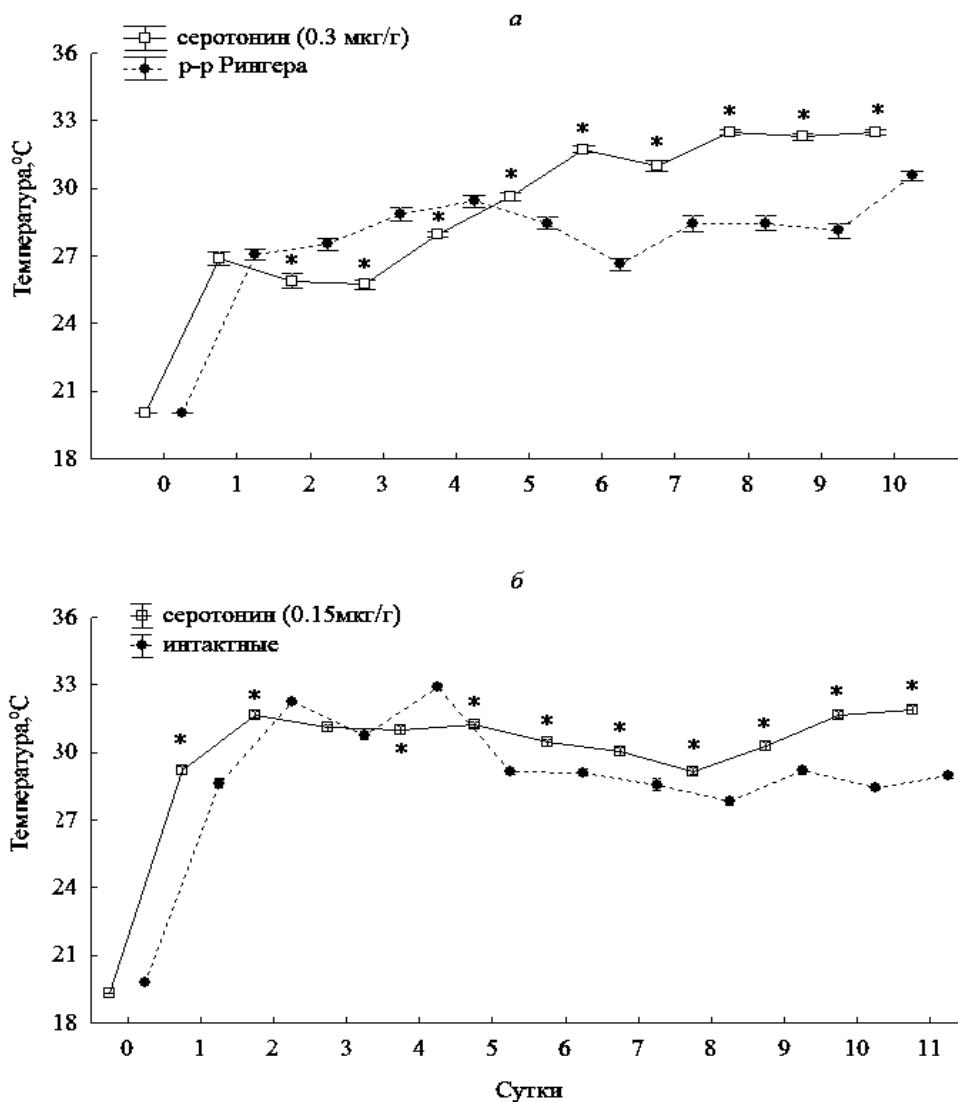


Рис. 3. Динамика значений среднесуточных избираемых температур ($M \pm m$) у карпов под воздействием внутримозговой инъекции серотонина: а — эксперимент I, б — эксперимент II (по: Garina et al., 2013).

В 4-й серии опытов первоначальное резкое возрастание среднесуточной избираемой температуры наблюдается у карасей обеих групп в течение первых двух суток наблюдения, после чего в опытной группе рыб значение показателя начинает постепенно снижаться (до 8 сут.), а затем снова возрастает (на 9–11 сут. эксперимента). В контрольной группе рыб максимальное увеличение показателя наблюдается на 4-е сут. опыта, после чего его значение значительно снижается (до 8 сут.), а затем так же, как и в опытной группе, возрастает к концу опыта. К концу эксперимента значение избираемой температуры у рыб опытной группы превышает таковое у рыб контрольной группы на 3.1°C ($p < 0.05$).

Таким образом, внутримозговое введение серотонина в обеих дозах вызывало достоверное увеличение избираемых температур у рыб во второй фазе эксперимента (начиная с 5-х сут. и до конца наблюдений). Нами был впервые продемонстрирован долгосрочный (до 11 сут.) эффект однократной инъекции серотонина на терморегуляционное поведение рыб. Это указывало на вовлечение иных, чем предполагалось ранее, механизмов терморегуляции с участием серотонина. В соответствии с нейрохимической моделью развития гипотермии у млекопитающих при гипоксии, серотонин понижает температуру тела животных, взаимодействуя с 5-HT_{1A}- and 5-HT₇-рецепторами (Branco et al., 2006) и активируя таким образом цАМФ- и цГМФ-пути в термоинтегративном центре ЦНС — преоптической области гипоталамуса (Steiner et al., 2002). Следствием этого является увеличение чувствительности теплочувствительных нейронов (Boulant, 2000) и ингибирование термогенеза (по: Viscgo et al., 2007). Однако широко известен факт, что эффекты серотонина, вызванные стимуляцией мембранных рецепторов и возрастанием вследствие этого концентрации вторичных мессенджеров в

клетке, краткосрочны. Отставленные эффекты серотонина на метаболизм рыб и, следовательно, их поведенческие реакции в наших экспериментах связаны, по-видимому, с синтезом серотонин-зависимых белков (по: Voronezhskaya et al., 2012). Необходимы дальнейшие исследования для выяснения долгосрочного эффекта серотонина на термоизбирательное поведение рыб.

3. Влияние серотонина на пищевое поведение карпов в условиях температурной неоднородности среды

Динамика среднесуточных избираемых температур у карпов под воздействием серотонина в 5-й и 6-й сериях экспериментов в целом была весьма близка к таковой в экспериментах, описанных в п. 2 (без добавления корма в установку), поэтому мы не будем останавливаться на этом подробно. Представляет интерес анализ интенсивности питания рыб в условиях температурной неоднородности среды, характер изменения которой под воздействием серотонина кардинальным образом отличается от такового в условиях среды с постоянной температурой (Кузьмина и др., 2010; Кузьмина, Гарина, 2013; de Pedro et al., 1998). Как в первом, так и втором экспериментах интенсивность питания рыб обеих групп, выраженная в процентах съеденного корма по отношению к массе тела, постепенно увеличивалась на протяжении опыта (рис. 4а, б).

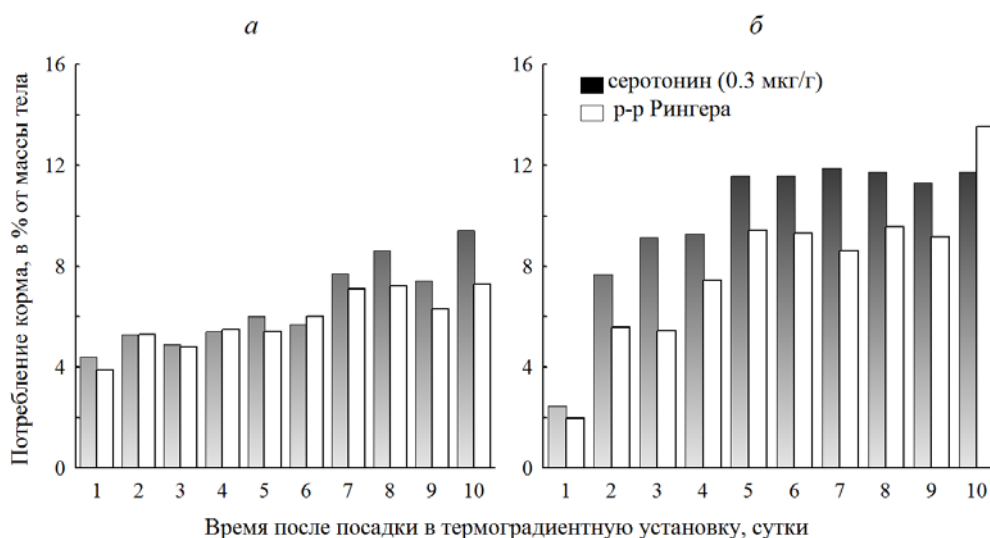


Рис. 4. Динамика потребления корма рыбами в термоградиентной установке под воздействием серотонина. Здесь и на рис. 5: а — эксперимент I, б — эксперимент II (по: Гарина и др., 2015).

Более значительный рост этого показателя наблюдался у рыб опытной группы. В первом эксперименте средняя интенсивность питания составляла 6.7 ± 0.5 и $6.1 \pm 0.3\%$ ($p > 0.05$) в опыте и контроле соответственно (рис. 4а). Отличия в интенсивности питания карпов опытной и контрольной группы во втором эксперименте выражены более чётко: 10.7 ± 0.5 и $8.1 \pm 0.3\%$ в опыте и контроле соответственно ($p < 0.05$) (рис. 4б). Необходимо отметить, что потребление корма в обеих группах карпов положительно коррелировало с величиной ИТ: в первом эксперименте — $r = 0.76$ ($p < 0.05$) в опыте и $r = 0.41$ ($p > 0.05$) в контроле, во втором эксперименте — $r = 0.92$ ($p < 0.05$) в опыте и $r = 0.73$ ($p < 0.05$) в контроле. Т.е., по мере продвижения рыб по температурному градиенту в сторону повышения температуры потребление корма возрастало.

Для анализа данных поедаемости кормовых объектов в отсеках был выбран интервал с 5-х по 10-е сут., поскольку в течение первых 4-х сут. эксперимента наблюдался переходный процесс температурного выбора. На рис. 5 приведены средние значения выедаемости корма в отсеках термоградиентной установки за указанный период рыбами обеих групп. При этом видно, что в первом эксперименте, где количество задаваемого корма было невелико, различия между опытной и контрольной группами были незначительны: рыбы питались фактически при идентичных температурах (рис. 5а). Очевидно, недостаток кормовых объектов в зоне температурного оптимума вынуждал рыб проводить поиск пищи в более широком диапазоне температур. Во втором эксперименте, где количество задаваемого корма было в 2.5 раза выше, чем в первом эксперименте, разница была очень заметна, рыбы опытной группы насыщались в «тёплых» отсеках установки с диапазоном температур 31–34°C. В то же время, рыбы контрольной группы питались в более широком диапазоне температур с максимумом при 28–29°C (рис. 5б).

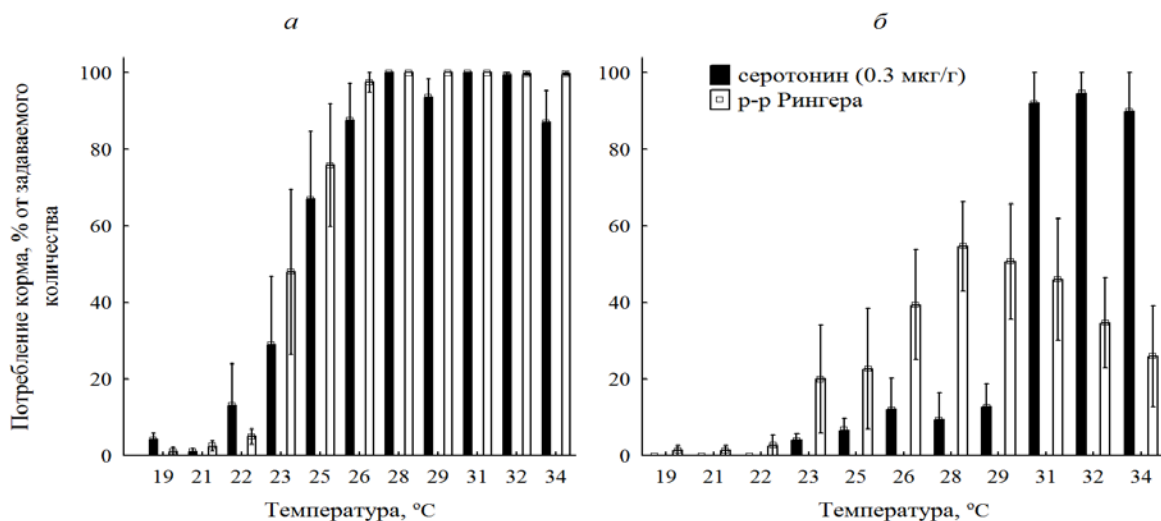


Рис. 5. Поедаемость корма карпами в отсеках экспериментальной установки. По оси ординат: среднее потребление корма рыбами в отсеках с соответствующей температурой за 6 дней наблюдения (5–10 сут.), % от задаваемого количества (по: Гарина и др., 2015).

Таким образом, было установлено, что в условиях температурной неоднородности среды серотонин, в отличие от экспериментов, проведённых при постоянной температуре, не угнетал потребление пищи у рыб. Напротив, наблюдалось возрастание интенсивности питания рыб, обусловленное, по-видимому, повышением интенсивности метаболизма по мере того, как рыбы начинают тратить всё больше времени на пребывание в отсеках с высокой температурой воды. При этом карпы, инъецированные серотонином, увеличивали потребление корма преимущественно в отсеках с наиболее высокой температурой воды, однако при недостаточном количестве доступного корма расширяли диапазон температурного поиска и поедали корм в отсеках с температурой воды значительно ниже оптимальной. Эти наблюдения свидетельствуют о сильном взаимном влиянии двух форм поведения животных (пищевого и термоизбирательного), определяющих их энергетический гомеостаз и темпы роста при наличии возможности выбора между оптимальной для жизнедеятельности температурой среды и наличием доступного корма.

4. Влияние внутримозговых инъекций холецистокинина на термоизбирательное поведение молоди серебряного карася

Было показано, что в 7-й серии экспериментов у карасей контрольной группы наблюдается возрастание среднесуточных избираемых температур в течение первых трех суток после инъекции (до $32.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$) (рис. 6а). После незначительного снижения величины показателя на 4–5 сут. отмечено её дальнейшее увеличение (до 32.8 ± 0.1 и $33.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ на 6-е и 8-е сут. соответственно), после чего значение избираемой температуры практически не меняется. В то же время, у карасей опытной группы происходит значительное увеличение среднесуточных избираемых температур лишь в течение первых двух сут. (до $28.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$), далее значение показателя остаётся относительно стабильным до конца эксперимента. При этом во все сроки наблюдения избираемые температуры у рыб опытной группы оказываются значительно ниже, чем у рыб контрольной группы. Максимальное уменьшение показателя у рыб опытной группы по сравнению с контролем зафиксировано на 6-е и 8-е сут.: на 5.3 и 5.5°C соответственно, $p < 0.05$ (рис. 6а).

В 8-й серии опытов, где была использована доза вводимого ХЦК₃₃, в 6 раз бóльшая по сравнению с предыдущим экспериментом, абсолютные величины среднесуточных избираемых рыбами температур несколько снижаются как в опыте, так и в контроле, возможно, вследствие сезонных факторов и несколько более высокой температурой адаптации (рис. 6б). Однако в целом картина динамики выбора температур близка к таковой в предыдущей серии. Во второй половине эксперимента происходит снижение показателя в контрольной группе рыб, тогда как в опытной его значение несколько увеличивается. Значения среднесуточных избираемых температур у карасей опытной группы ниже таковых контрольной группы почти на всём протяжении эксперимента, за исключением 1-х и 9-х сут. Максимальное снижение показателя в опытной группе по сравнению с контрольной зарегистрировано на 3-е, 5-е и 6-е сут. опыта (на 4.1 , 3.4 и 3.6°C соответственно, $p < 0.05$).

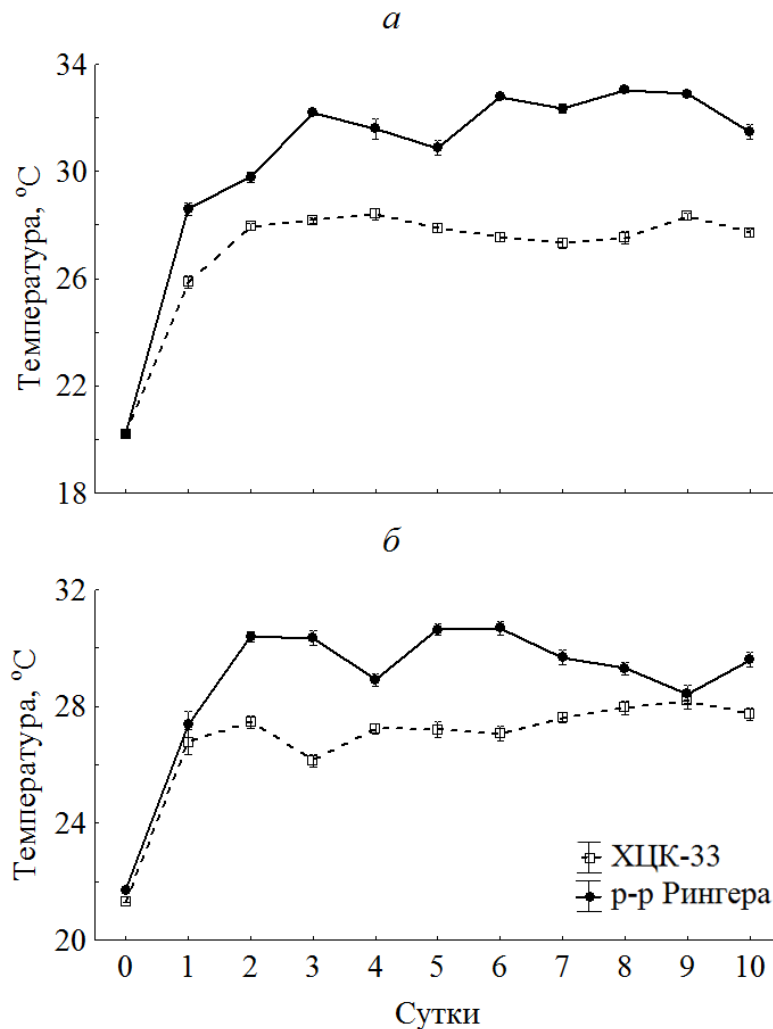


Рис. 6. Динамика среднесуточных избираемых температур у карася под влиянием холецистокинина: а — эксперимент I (доза 1 нг/г), б — эксперимент II (доза 6 нг/г) (по: Кузьмина и др., 2015).

Таким образом, результаты двух серий экспериментов свидетельствуют о значительном (на 4–5.5°C) понижении избираемых рыбами температур под воздействием центральной инъекции ХЦК₃₃. Эти результаты, по нашему мнению, согласуются с результатами ряда работ, полученными при исследовании млекопитающих. В частности, было показано, что центральные микроинъекции холецистокинина вызывают у крыс повышение температуры тела; этот эффект ослабляется введением антагонистов рецепторов ХЦК₂-типа. Предполагается, что холецистокинин выполняет специфическую роль в развитии лихорадки у млекопитающих (Szelényi, 2010). Поскольку сведения, касающиеся механизмов, посредством которых холецистокинин может оказывать своё терморегуляторное действие на холоднокровных животных, до настоящего исследования полностью отсутствовали, на основании первых, полученных нами данных не представляется возможным выдвинуть гипотезу о таких механизмах, и мы ограничимся констатацией факта: холецистокинин вызывает у рыб понижение избираемых температур, изменяя, по всей видимости, чувствительность центральных терморцепторов.

5. Влияние холецистокинина на пищевое и терморегуляционное поведение карасей в условиях температурной неоднородности среды

В 9-й серии экспериментов установлено, что максимальное количество корма (выраженное в процентах по отношению к массе тела), рыбы контрольной группы потребляли на 2–5-й дни после посадки в установку — 2.3–2.8% (рис. 7). На 6-й день после инъекции караси довольно значительно снижали интенсивность питания (до 1.3%), и затем величина показателя вновь начинала увеличиваться и достигала к концу эксперимента 2.3%. В то же время, суммарное потребление корма карасями опытной группы на 2–5-й дни было ниже, чем в контрольной группе в два раза: 1.1–1.4%. Во второй половине эксперимента, с 6 по 10-й дни, интенсивность питания рыб опытной группы, как и кон-

трольной, начинала постепенно возрастать; различия в количестве потребляемого корма у рыб обеих групп были крайне незначительны.

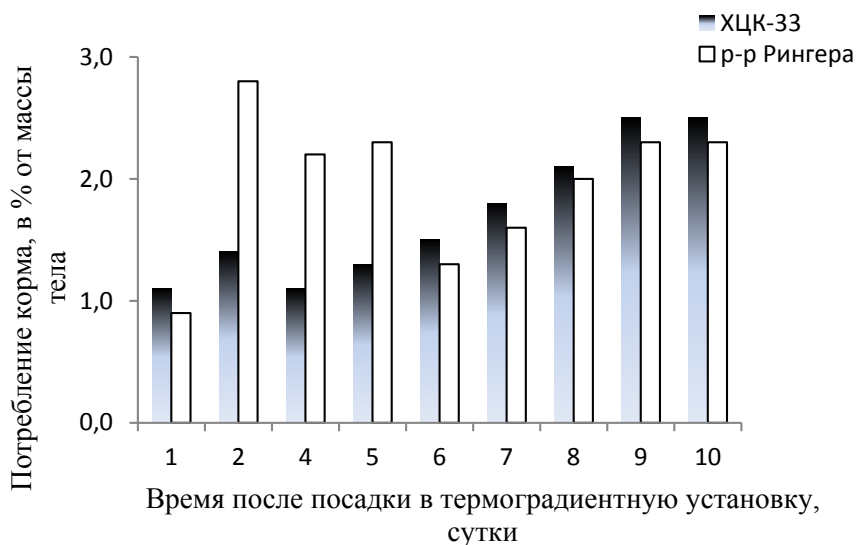


Рис. 7. Динамика потребления корма рыбами в термоградиентной установке при воздействии холецистокинина.

Очевидно, что, в отличие от эффекта серотонина, холецистокин отчётливо снижает интенсивность питания карасей в первые сутки после инъекции (до 5 сут.). В дальнейшем, по-видимому, препарат перестаёт действовать, и количество потребляемого корма рыбами постепенно восстанавливается. Отличительной чертой является также резкое, а не постепенное возрастание интенсивности питания рыб контрольной группы в первые дни после инъекции (за исключением первого дня). Можно предположить, что это вызвано недостаточной упитанностью особей, использованных в эксперименте; в первые дни рыбы активно компенсировали недостаток питания в предыдущих условиях содержания.

Как и при исследовании серотонина, для анализа данных поедаемости кормовых объектов в отсеках нами был выбран интервал с 4-х по 10-е сут., поскольку в течение первых 4-х сут. эксперимента наблюдался переходный процесс температурного выбора. На рис. 8 приведены средние значения выедаемости корма в отсеках термоградиентной установки за указанный период рыбами обеих групп.

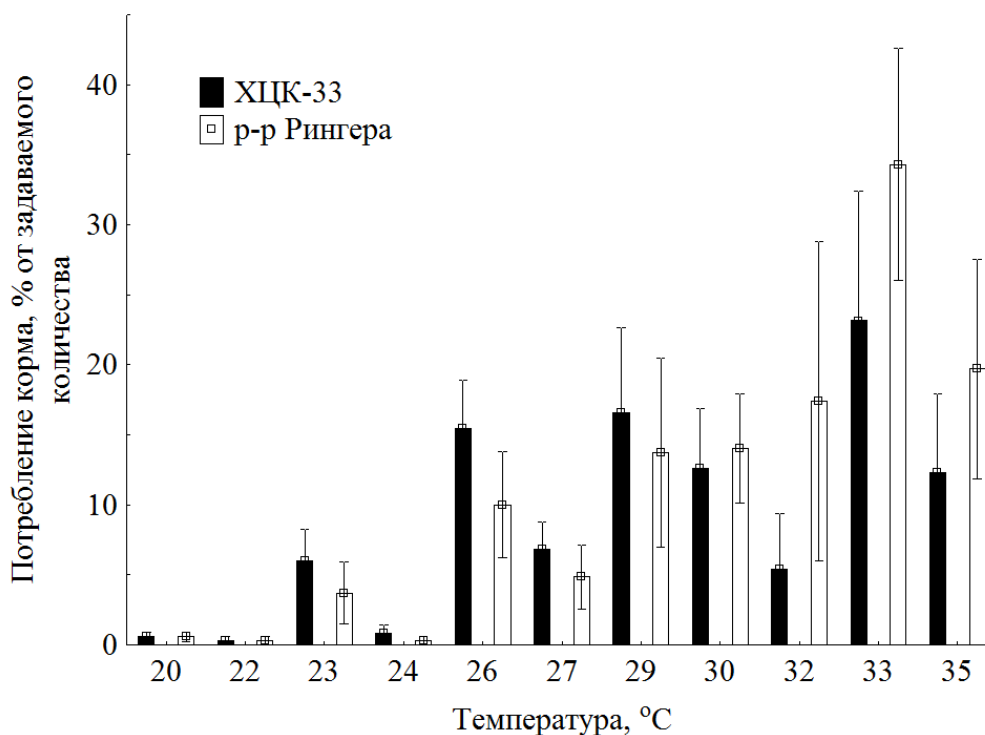


Рис. 8. Поедаемость корма карасями в отсеках экспериментальной установки. По оси ординат: среднее потребление корма рыбами в отсеках с соответствующей температурой за 7 дней наблюдения (4–10 сут.), % от задаваемого количества.

При этом видно, что рыбы контрольной группы выедают наибольшее количество корма при самых высоких температурах: 32, 33 и 35°C (17.4%, 34.3% и 19.7% соответственно). Разница в количестве потребляемого корма у карасей опытной и контрольной групп наиболее высока именно в этих отсеках, с максимальной температурой воды. В то же время, в отсеках с температурой 29°C и ниже интенсивность питания у рыб, инъецированных ХЦК-33, даже несколько выше таковой у карасей контрольной группы, несмотря на снижение интенсивности их питания в целом (см. рис. 7). Это свидетельствует о том, что под воздействием нейропептида рыбы не только снижают суммарную интенсивность питания, но и среднесуточную избираемую температуру, что сказывается на увеличении количества поедаемого ими корма в отсеках с температурой ниже оптимума. Как тот, так и другой эффект хорошо согласуются с данными, полученными на млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённой авторским коллективом работы были подтверждены сведения, ранее полученные другими исследователями в краткосрочных экспериментах, о важной роли серотонина в центральной регуляции избираемых температур у костистых рыб, а также получен ряд принципиально новых данных. В частности, впервые продемонстрирован долгосрочный (до 11 сут.) эффект снижения избираемых температур после однократной инъекции серотонина, что опровергает ранее предложенную схему терморегуляции у животных с участием этого нейромедиатора. Эта схема предполагает причиной данного эффекта взаимодействие серотонина с мембранными рецепторами и активацию систем вторичных мессенджеров в термоинтегративном центре мозга и, как следствие, изменение чувствительности центральных терморепцепторов. Однако указанные эффекты краткосрочны и не могут продолжаться 10–11 сут. Следовательно, отставленные эффекты серотонина на метаболизм и поведенческие реакции рыб в наших экспериментах обусловлены, по всей вероятности, синтезом серотонин-зависимых белков (по: Voronezhskaya et al., 2012). Выявленный феномен интересен и требует дальнейших исследований для выяснения его природы и механизмов. Результаты опытов, в которых уровень серотонина в мозге увеличивали путём скармливания животным серотонинотропного препарата, в целом совпадают с данными опытов, в которых серотонин вводили в желудочек мозга рыб. Однако степень выраженности эффекта в первых опытах сильно зависела от температуры предварительной акклимации. Также было установлено, что в условиях температурной неоднородности среды серотонин, в отличие от экспериментов, проведённых при постоянной температуре, не угнетал потребление пищи у рыб. Напротив, наблюдалось возрастание интенсивности питания рыб, обусловленное, по-видимому, повышением интенсивности метаболизма по мере того, как рыбы начинают тратить всё больше времени на пребывание в отсеках с высокой температурой воды. При этом рыбы, инъецированные серотонином, увеличивали потребление корма преимущественно в отсеках с наиболее высокой температурой воды, однако при недостаточном количестве доступного корма расширяли диапазон температур и поедали корм в отсеках с температурой воды значительно ниже оптимальной. Эти наблюдения свидетельствуют о сильном взаимном влиянии двух форм поведения животных (пищевого и термоизбирательного), определяющих их энергетический гомеостаз и темпы роста при наличии возможности выбора между оптимальной для жизнедеятельности температурой среды и наличием доступного корма.

Данных, касающихся роли холецистокинина в центральной терморегуляции у рыб (полученных как авторским коллективом, так и другими исследователями), значительно меньше. Нами установлено, что под воздействием центральной инъекции ХЦК₃₃ происходит значительное понижение избираемых рыбами температур (на 4.0–5.5°C). Мы предполагаем, что холецистокинин вызывает у рыб понижение избираемых температур, изменяя, по-видимому, чувствительность центральных терморепцепторов. Кроме того, в опытах по влиянию ХЦК₃₃ на пищевое и термоизбирательное поведение карасей в условиях температурной неоднородности среды показано, что нейропептид отчётливо снижает интенсивность питания карасей в первые сутки после инъекции (до 5 сут.). При этом рыбы не только снижают суммарную интенсивность питания, но и среднесуточную избираемую температуру, что сказывается на увеличении количества поедаемого ими корма в отсеках с температурой ниже оптимума. Как тот, так и другой эффект хорошо согласуются с данными, полученными на млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты №№09-04-00075 и 13-04-00248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гарина Д.В., Смирнов А.К. Влияние серотонинотропного препарата флуоксетина на избираемые температуры у молоди плотвы *Rutilus rutilus* (L.) (сем. Cyprinidae, отр. Cypriniformes), акклимированной к различным температурам // Вопр. ихтиол. 2012. Т. 52. № 4. С. 508–512. [Garina D.V., Smirnov A.K. Effects of fluoxetine, a selective re-uptake inhibitor, on preferred temperature in juvenile roach, *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Cypriniformes), ac-

- climated to different temperatures // J. Ichthyology. 2012. Vol. 52. No. 4. P. 508–512. DOI: 10.1134/S0032945212040029.] In Russian.
- Гарина Д.В., Смирнов А.К., Русанова П.В., Кузьмина В.В. Влияние серотонина на пищевое и терморегуляционное поведение карпов *Cyprinus carpio* в условиях температурной неоднородности среды // Пробл. биол. продукт. жив. 2015. № 1. С. 53–60. Garina D.V., Smirnov A.K., Rusanova P.V., Kuz'mina V.V. Vliyanie serotoninina na pishchevoe i termoregulyatsionnoe povedenie karpov *Cyprinus carpio* v usloviyakh temperaturnoi neodnorodnosti sredy // Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh // 2015. № 1. S. 53–60. [Garina D.V., Smirnov A.K., Rusanova P.V., Kuz'mina V.V. The influence of serotonin on feeding and thermoregulatory behavior of carps *Cyprinus carpio* in heterothermal conditions // Problems of Biology of Productive Animals. 2015. No. 1. P. 53–60.] In Russian.
- Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты терморегуляционного поведения пресноводных рыб // Докл. II Всерос. совещ. «Поведение рыб». Борок, 1996. С. 16–40. Golovanov V.K. Ekologo-fiziologicheskie aspekty termoregulyatsionnogo povedeniya presnovodnykh ryb // Doklady II Vserossiiskogo soveshchaniya "Povedenie ryb". Borok, 1996. S. 16–40. [Golovanov V.K. Ecological and physiological aspects of thermoregulatory behavior of freshwater fish // Proceedings of Second All-Russian Meeting on Fish Behavior. Borok, 1996. P. 16–40.] In Russian.
- Голованов В.К., Смирнов А.К., Капшай Д.С. Окончательно избираемые и верхние летальные температуры у молоди некоторых видов пресноводных рыб // Труды Карельского научного центра РАН. Сер. Экспериментальная биология. 2012. № 2. С. 70–75. Golovanov V.K., Smirnov A.K., Kapshaj D.S. Okonchatel'no izbiraemye i verkhnie letal'nye temperatury u molodi nekotorykh vidov presnovodnykh ryb // Trudy Karel'skogo nauchnogo tzentra RAN. Ser. Experimental'naya biologiya. 2012. №2. S. 70–75. [Golovanov V.K., Smirnov A.K., Kapshaj D.S. Final thermopreferendum and upper lethal temperature in juveniles of some freshwater fish species. 2012. No. 2. P. 70–75.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Гарина Д.В. Влияние периферически введённого серотонина на пищевую и двигательную активность карпа *Cyprinus carpio* L. // Биол. внутр. вод. 2013. № 1. С. 1–9. [Kuz'mina V.V., Garina D.V. The effects of peripherally injected serotonin on feeding and locomotor activities in carps *Cyprinus carpio* L. // Biol. Inland Waters. 2013. Vol. 6. No. 1. P. 62–69. DOI:10.1134/S1995082913010082.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Влияние серотонина на активность пищеварительных гидролаз у карпа // Пробл. биол. продукт. живот. 2013. № 4. С. 53–60. Kuz'mina V.V. Vliyanie serotoninina na aktivnost' pishchevaritel'nykh gidrolaz u karpa // Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh. 2013. № 4. S. 53–60. [Kuz'mina V.V. The influence of serotonin on the activity of digestive enzymes in carp // Problems of Biology of Productive Animals. 2013. Vol. 4. P. 53–60.] In Russian.
- Кузьмина В.В. Влияние диеты на пищевое поведение карпа *Cyprinus carpio* и эффекты серотонина // Пробл. биол. продукт. жив. 2015. № 3. С. 48–58. Kuz'mina V.V. Vliyanie diety na pishchevoe povedenie karpa *Cyprinus carpio* i efekty serotoninina // Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh. 2015. № 3. S. 48–58. [Kuz'mina V.V. The influence of diet on feeding behavior of carp *Cyprinus carpio* and the effects of serotonin // Problems of Biology of Productive Animals. 2015. No. 3. P. 48–58.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Ушакова Н.В., Русанова П.В. Влияние экзогенного серотонина на пищевое поведение карпа *Cyprinus carpio* L // Вестн. Морд. ун-та. 2010. № 1. С. 59–64. Kuz'mina V.V., Ushakova N.V., Rusanova P.V. Vliyanie exogennoho serotoninina na pishchevoe povedenie karpa *Cyprinus carpio* L // Vestnik Mordovskogo Universiteta. 2010. № 1. S. 59–64. [Kuz'mina V.V., Ushakova N.V., Rusanova P.V. The influence of exogenous serotonin on feeding behavior of carp *Cyprinus carpio* L // The Herald of Mordovian University. 2010. No. 1. P. 59–64.] In Russian.
- Кузьмина В.В., Гарина Д.В., Смирнов А.К., Меньшакова П.В. Влияние холецистокинина на пищевое и терморегуляционное поведение карася *Carassius auratus* // Пробл. биол. продукт. жив. 2015. № 4. С. 82–92. Kuz'mina V.V., Garina D.V., Smirnov A.K., Men'shakova P.V. Vliyanie kholetsistokinina na pishchevoe i termoregulyatsionnoe povedenie karasya *Carassius auratus* // Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh. 2015. № 4. S. 82–92. [Kuz'mina V.V., Garina D.V., Smirnov A.K., Men'shakova P.V. The influence of cholecystokinin on feeding and thermoregulatory behavior of goldfish *Carassius auratus* // Problems of Biology of Productive Animals. 2015. No. 4. P. 82–92.] In Russian.
- Лапкин В.В., Сvirский А.М., Голованов В.К. Возрастная динамика избираемых и летальных температур // Зоол. журн. 1981. Т. 60. № 12. С. 1792–1801. Lapkin V.V., Svirskiy A.M., Golovanov V.K. Vozrastnaya dinamika izbiraemykh i letal'nykh temperatur // Zoologicheskii zhurnal. 1981. T. 60. № 12. S. 1792–1801. [Lapkin V.V., Svirskiy A.M., Golovanov V.K. Age dynamics of preferred and lethal temperatures // J. Zoology. 1981. Vol. 60. No. 12. S. 1792–1801.] In Russian.
- Смирнов А.К. Влияние наличия пищи в зоне температурного оптимума на поведение молоди речного окуня *Perca fluviatilis* L. // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хоз-во. 2013. № 1. С. 75–82. Smirnov A.K. Vliyanie nalichiya pishchi v zone temperaturnogo optimuma na povedenie molodi rechnogo okunya *Perca fluviatilis* L. // Vestnik AGTU. Seriya: Rybnoe khozyaistvo. 2013. № 1. S. 75–82. [Smirnov A.K. Influence of food presence in the zone of temperature optimum upon behavior of young perch *Perca fluviatilis* L. // The Herald of Astrakhan State Technical University. Series: Fisheries. 2013. No. 1. P. 75–82.] In Russian.

- Balaskó M., Rostás I., Füredi N., Mikó A., Tenk J., Cséplő P., Koncsecskó-Gáspár M., Soós S., Székely M., Pétervári E. Age and nutritional state influence of the effects of cholecystokinin on energy balance // *Exp. Gerontology*. 2013. Vol. 48. P. 1180–1188.
- Beinfeld M.C., Palkovits M. Distribution of cholecystokinin (CCK) in the hypothalamus and limbic system of the rat // *Neuropeptides*. 1981. Vol. 2. P. 123–129.
- Bicego K.C., Barros R.C.H., Branco L.G.S. Physiology of temperature regulation: comparative aspects // *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 2007. Vol. 147. P. 616–639.
- Boulant J.A. Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever // *Clin. Infect. Dis.* 2000. Vol. 31 (S5). P.157–161.
- Branco L.G.S., Gargaglioni L.H., Barros R.C.H. Anapyrexia during hypoxia // *J. Therm. Biol.* 2006. Vol. 31. P. 82–89.
- Day N.C., Hall M.D., Clark C.R., Hughes J. High concentration of cholecystokinin receptor binding sites in the ventromedial hypothalamic nucleus // *Neuropeptides*. 1986. Vol. 8. P. 1–18.
- de Boeck G., Nilsson G., Vlaeminck A., Blust R. Central monoaminergic responses to salinity and temperature rises in common carp // *J. Exp. Biol.* 1996. Vol. 199. No. 7. P. 1605–1611.
- de Pedro N., Pinillos M.L., Valenciano A.I., Alonso-Bedate M., Delgado M.J. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF // *Peptides*. 1998. Vol. 12. No. 3. P. 505–511.
- Dockray G. J. Cholecystokinin and gut-brain signalling // *Reg. Peptides*. 2009. Vol. 155. No. 1–3. P. 6–10.
- Donovan M.H., Tecott L.H. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance // *Frontiers in Neuroscience*. 2013. Vol. 7. No. 36. P. 1–15.
- Fletcher P.J., Burton M.J. Microstructural analysis of the anorectic action of peripherally administered 5-HT // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986. Vol. 24. P. 1134–1136.
- Garina D.V., Smirnov A.K., Kuz'mina V.V. The long-term effect of serotonin on the thermoregulatory behavior on juvenile cyprinidae (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) // *Fish Physiol. Biochem.* 2013. Vol. 39. P. 1373–1376.
- Golovanov V.K., Smirnov A.K., Garina D.V. Thermoregulatory behavior as a form of the temperature adaptation in freshwater teleosts of boreal climatic zone. *Teleosts: evolutionary development, diversity and behavioral ecology*. New York: Nova Science Publishers. 2014. P. 153–198.
- Hall T.R., Uruena G., Figueroa H.R. *In vivo* and *in vitro* effects of temperature on monoamine oxidase activity in brain and other tissues of the goldfish, *Carassius auratus* (L.) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. Vol. 73C. P. 177–180.
- Himick B.A., Peter R.E. CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish // *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 267. P. 841–851.
- Kuz'mina V.V. Effect of serotonin on exotrophy processes in fish // *New developments in serotonin research*. (Ed. Ming D. Li). Ch. 5. New York: Nova Science Publishers. 2015. P. 89–122.
- Murashita K., Kurokawa T., Nilsen T.O., Ronnestad I. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmosalar*): molecular cloning and tissue expression // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009. Vol. 160. P. 223–235.
- Orchard I. Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus* // *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.* 2006. Vol. 144. P. 316–324.
- Penney C.C., Volkoff H. Peripheral injections of cholecystokinin, apelin, ghrelin and orexin in cavefish (*Astyanax fasciatus mexicanus*): Effects on feeding and on the brain expression levels of tyrosine hydroxylase, mechanistic target of rapamycin and appetite-related hormones // *Gen. Compar. Endocrinol.* 2014. Vol. 196. P. 34–40.
- Peyon P., Saied H., Lin X., Peter R.E. Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain // *Molecular. Brain Res.* 1999. Vol. 74. No. 1–2. P. 190–196.
- Rubio V.C., Sánchez-Vázquez F.J., Madrid J.A. Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. // *Physiol. Behav.* 2008. Vol. 93. No. 4–5. P. 862–869.
- Ruibal C., Soengas J.L., Aldegunde M. Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in plasma glucose levels // *J. Comp. Physiol. A*. 2002. Vol. 188. P. 479–484.
- Shiraishi T. CCK as a central satiety factor: behavioral and electrophysiological evidence // *Physiol. Behav.* 1990. Vol. 48. P. 879–885.
- Simansky K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety // *Behav. Brain Res.* 1996. Vol. 73. P. 37–42.
- Steiner A.A., Rocha M.J.A., Branco L.G.S. A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapyrexia // *Am. J. Physiol.* 2002. Vol. 283. P. 1412–1422.
- Szelényi Z., Székely M., Hummel Z., Balaskó M., Romanovsky A.A., Pétervári E. Cholecystokinin: possible mediator of fever and hypothermia // *Frontiers Biosci.* 2004. Vol. 9. P. 301–308.
- Szelényi Z. Cholecystokinin: role in thermoregulation and other aspects of energetics // *Clin. Chim. Acta*. 2010. Vol. 411. No. 5–6. P. 329–335.
- Tecott L.H. Serotonin and the orchestration of energy balance // *Cell. Metab.* 2007. Vol. 6. P. 352–361.
- Thavanathan R., Volkoff H. Effects of amylin on feeding of goldfish: Interactions with CCK // *Reg. Peptides*. 2006. Vol. 133. No. 1–3. P. 90–96.
- Tsai Ch.-L., Wang L.-H. Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters, serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus* // *Neurosci. Letters*. 1997. Vol. 233. P. 77–80.
- Tsai Ch.-L., Wang L.-H., Tsai Ch.-Ch. Role of serotonin, γ -aminobutyric acid, and glutamate in the behavioral thermoregulation of female tilapia during prespawning phase // *J. Exp. Zool.* 2002. Vol. 293. P. 443–449.

- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P., Ivashkin E.G. 2012. Delayed action of serotonin in molluscan development // *Acta Biologica Hungarica*. Vol. 63. No. 2. P. 210–216.
- Yamada J., Sugimoto Y., Ujikawa M. Involvement of leptin in hypophagia induced by the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in mice // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. Vol. 29. P. 557–559.

THE ROLE OF SEROTONIN AND CHOLECYSTOKININ IN THE REGULATION OF THERMO PREFERENTIAL AND FEEDING BEHAVIOR OF FISH

D. V. Garina, V. V. Kuz'mina, A. K. Smirnov, P. V. Men'shakova

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences
152742, Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: garinadv@mail.ru*

Physiological and biochemical aspects of thermo selective behavior of fish remain poorly studied to date, despite the considerable relevance of the problem. The important role in central thermoregulation belongs to the brain systems of neurotransmitters such as norepinephrine, serotonin, dopamine and others, changes in central balance of which cause the cascade of biochemical reactions in a brain. The result of these reactions is thermo preferential behavioral response and finally body temperature change. At the same time key neurotransmitters including serotonin and cholecystokinin, participate in the regulation of another form of fish behavior responsible for maintenance of energy homeostasis — feeding behavior. In the present article the data received by a group of authors over the past five years concerning the role of serotonin and cholecystokinin in central regulation of feeding behavior and thermopreference in freshwater teleost fish are generalized.

Key words: teleost fish, serotonin, cholecystokinin, thermo selective and feeding behavior.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕМПЕРАТУРНОГО ОПТИМУМА И ВЕРХНЕЙ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ГРАНИЦЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ У МОЛОДИ РЫБ, ОБИТАЮЩИХ В ВОДОЕМАХ ВЕРХНЕЙ ВОЛГИ

В. К. Голованов, Д. С. Капшай

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН,
152742, пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: vkgolovan@mail.ru*

Проанализированы показатели эколого-физиологического оптимума и пессимума рыб, в том числе окончательно избираемая температура (ОИТ) и верхние летальные температуры, критический термический максимум (КТМ) и хронический летальный максимум (ХЛМ)). Исследованы 14 видов рыб из 7 семейств (при акклимации в диапазоне температуры от 14 до 22°C) в летний и осенний сезоны года. Для анализа привлечены также данные об аналогичных показателях у 18 видов рыб из других 7 семейств, полученные ранее. Выполнена классификация рыб по отношению к температурному фактору среды. Сделан вывод о том, что случае дальнейшего потепления климата многие теплолюбивые виды рыб из перечисленных выше не испытывают особых проблем. У них, как показывают приведенные данные, существует определенный «температурный запас прочности» в несколько градусов. Это связано с тем, что большинство видов, обитающих в северо-западных и центральных регионах Европейской части России, существуют в условиях температуры на несколько градусов ниже значений их ЭФО. Для холодолюбивых видов (налим, радужная форель, пелядь, корюшка) повышение среднегодовой температуры на несколько градусов может представлять определенную угрозу. Гораздо более опасными для всех видов являются случаи аномального повышения температуры в летний сезон года, аналогично тому, как это произошло летом 2010 г. Изучение термоадаптаций рыб, их окончательно избираемой температуры как аналога температурного оптимума роста и развития, а также той зоны температуры, которая может при определенных ситуациях привести к летальному исходу, важно не только в теоретическом аспекте. Такие количественные показатели как ОИТ и ВЛТ (КТМ и ХЛМ) позволяют не только проводить экспертную оценку условий существования рыб, но и прогнозировать особенности их роста, развития, воспроизводства, поведения и распределения в термально неоднородной среде.

Ключевые слова: рыбы, температура среды, эколого-физиологический оптимум, пессимум, окончательно избираемая температура, верхняя летальная температура, критический термический максимум, хронический летальный максимум, классификация, температурный фактор, прогнозирование.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение температурных адаптаций рыб представляет существенный интерес в силу того, что позволяет оценить потенциальные возможности их продуктивности. Традиционно, при исследовании биологии и экологии рыб рассматриваются вопросы динамики численности, видового состава, разнообразия, влияния антропогенных факторов, уровня и температурного режима в водоемах разного типа, трофических условий среды. Поскольку температура окружающей среды является одним из наиболее важных экологических факторов, актуально оценивать не только ее роль в перечисленных выше вопросах. Необходимо определять в каждый конкретный момент времени, исходя из температурных условий обитания, насколько они оптимальны или пессимальны для жизнедеятельности рыб (Голованов, 2013а, б). Такая информация в последнее время становится все более востребованной ввиду тенденции к потеплению климата, возникновению экстремальных ситуаций в пресных и морских водах, роста объема зон подогретых вод от АЭС, ГРЭС и крупных промышленных предприятий, усиления антропогенного воздействия на водоемы, а также инвазий чужеродных видов.

Термоадаптационные характеристики пресноводных рыб, обитающих в бассейне Верхней Волги, исследуются в лаборатории экологии рыб Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина, начиная с 1974 г. Наиболее интенсивно они проводились в течение 1974–1981, 1986–1991, 1999–2005 гг. и, наконец, с 2006 г. по настоящее время. Проведена классификация экспериментальных данных по температурным реакциям рыб, характеризующим температурный оптимум и пессимум их жизнедеятельности (Голованов, 2013а, б). В последние годы (2005–2015) предпринята попытка исследовать ряд новых видов, включая виды-вселенцы, а также верифицировать полученные ранее данные, с учетом наших новых исследований, а также материалов, опубликованных за рубежом.

Температурный диапазон существования пресноводных рыб, от -2 до 43.5°C, подразделяется на интервалы, характеризующие верхние и нижние границы жизнедеятельности (пессимум) и оптимальную зону функционирования (оптимум) (Schmidt-Nielsen, 1979; Alabaster, Lloyd, 1980; Jobling, 1981; Golovanov, 2006; Голованов, 2013а, б). Значения эколого-физиологического оптимума определяют посредством разных методов. Достаточно часто определяют оптимальную температуру роста рыб (ОТР). Одним из наиболее применяемых в последнее время является метод «конечного термо-

преферендума», когда животным предоставляется возможность самопроизвольно выбирать оптимальную температуру в градиенте фактора (Jobling, 1981; Golovanov, 2006; Голованов, 2013а, б).

Температура, которую рыбы избирают в начальный период опыта (минуты и часы, несколько дней), называется избираемой температурой (ИТ). Зона стабильной температуры, которую рыбы избирают спустя несколько дней, иногда 1–2 недели в градиенте температуры, определяется как их окончательно избираемая температура (ОИТ). Значение ОИТ практически совпадает с показателями эколого-физиологического оптимума (ЭФО), максимальным ростом и эффективным питанием для многих видов рыб (Jobling, 1981; Golovanov, 2006; Голованов, 2013а, б). Именно поэтому определение ИТ и в особенности ОИТ у рыб и беспозвоночных представляется крайне важным (Вербицкий, 2012; Голованов, 2013а, б). Несмотря на большое количество данных по ИТ и ОИТ рыб как в отечественной, так и в зарубежной литературе, их явно недостаточно. Кроме того, применение полученных ранее характеристик ОИТ нуждается в детализации с тем, чтобы более точно интерпретировать экспериментальные данные в целях рыбного хозяйства (Cherry, Cairns, 1982; Голованов и др., 1997; Голованов, 2013а, б). Не менее важны и особенности термоизбирания молоди и более взрослых рыб, которые они проявляют в экспериментальном термоградиенте. Даже результаты опытов всего на нескольких особях иногда представляют существенный интерес, поскольку практически дают начальное представление о том, к какой группе рыб по отношению к температурному фактору относится тот или иной вид.

О верхней границе жизнедеятельности рыб судят по верхней летальной температуре (ВЛТ). Значения ВЛТ определяют различными методами — температурного скачка, критического термического максимума (КТМ) и хронического летального максимума (ХЛМ) (Becker, Genoway, 1979; Beitinger et al., 2000; Голованов и др., 2012, Голованов, 2013а, б). В последнее время чаще используют два последних метода. При использовании метода КТМ создают нагрев воды со скоростью от 1–2 до 60°C/ч вплоть до момента переворота рыб на бок или кверху брюшком. В случае продолжения нагрева получают значение летальной температуры (ЛТ), характеризующее прекращением дыхательных движений жаберных крышек. Значение ЛТ, как правило, несколько выше значений КТМ. При использовании метода ХЛМ применяют медленный нагрев воды со скоростью 1–2°C/сут, что позволяет рыбам (в отличие от метода КТМ) постоянно акклиматизироваться к постепенному повышению температуры среды. Важно представлять тот факт, что под определением ВЛТ понимается вся совокупность показателей, полученных самими разными методами. При этом, значение КТМ фактически характеризует зону сублетальной температуры, при которой еще возможен возврат к нормальной жизнедеятельности (в случае возвращения в более низкую температуру среды). В то же время показатель ЛТ фиксирует уже момент непосредственной гибели рыб, так же, как и показатель ХЛМ. В отличие от значения ОИТ, характеризующего эколого-физиологический оптимум жизнедеятельности рыб, значения ВЛТ характеризуют величину эколого-физиологического пессимума (Jobling, 1981; Beitinger et al., 2000; Голованов, 2013а, б).

Цель работы — выявление окончательно избираемой температуры и особенностей термоизбирания в условиях экспериментального температурного градиента, а также верхней летальной температуры методами КТМ и ХЛМ у 14-и видов рыб из 7-и семейств в возрасте от 0+ до 3+ в летний и осенний сезоны года.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В период с июня по ноябрь в 2004–2015 гг. исследованы следующие 14 видов рыб из 7-ми семейств: ESOCIDAE — (*Esox lucius* Linnaeus, 1758 — обыкновенная щука); CYPRINIDAE (*Abramis brama* Linnaeus, 1758 — лещ; *Abramis ballerus* Linnaeus, 1758 — синец; *Alburnus alburnus* Linnaeus, 1758 — уклейка; *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 — сазан или обыкновенный карп; *Carassius auratus gibelio* Bloch, 1782 — серебряный карась; *Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758 — плотва; *Gobio gobio* Linnaeus, 1758 — пескарь; *Phoxinus phoxinus* Linnaeus, 1758 — обыкновенный гольян); COBITIDAE (*Misgurnus fossilis* Linnaeus, 1758 — вьюн); ODONTOBUTIDAE (*Perccottus glenii* Dybowski, 1877 — головешка-ротан); BALITORIDAE (*Barbatula barbatula* Linnaeus, 1758 — усатый голец); PERCIDAE (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 — речной окунь); сем. GOBIIDAE (*Neogobius melanostomus* Pallas, 1814 — бычок-кругляк; *Proterorhinus marmoratus* Pallas, 1814 — бычок-цуцик). Большинство рыб отловлено в прибрежье Рыбинского водохранилища, карп — из прудов стационара экспериментальных и полевых исследований «Сунога» ИБВВ РАН, серебряный карась и головешка-ротан — в прудах Некоузского района Ярославской области, бычок-головач — в Горьковском водохранилище.

После отлова рыб доставляли в лабораторию и помещали в аквариумы объемом от 60 до 300 л с отстоянной водопроводной водой, а также регулируемой температурой и аэрацией. Всех рыб акклиматизировали в течение 7–14 дней к температуре, близкой к средним значениям летнего сезона (14–22°C) и содержали в условиях естественного фотопериода при периодической смене воды. В период акклиматизации и во время опытов рыб кормили живым кормом (дафния, зоопланктон, олигохеты, личинки

хириноид), рыбным фаршем, сухим кормом (дафния, рыбный комбикорм) в объеме 5–10% от массы тела. Сеголетков щуки кормили молодь рыб.

При определении ИТ и ОИТ использован метод «конечного термопреферендума» (Голованов и др., 2012; Голованов, 2013а, б), при котором рыбам предоставляется возможность свободного выбора температуры в условиях термоградиента. Подробно схемы экспериментальных установок для определения ИТ и ОИТ описаны ранее (Ивлев, 1962; Голованов и др., 2012; Голованов, 2013а, б). Схема экспериментальных термоградиентных установок, использованных нами, приведена на рис. 1.

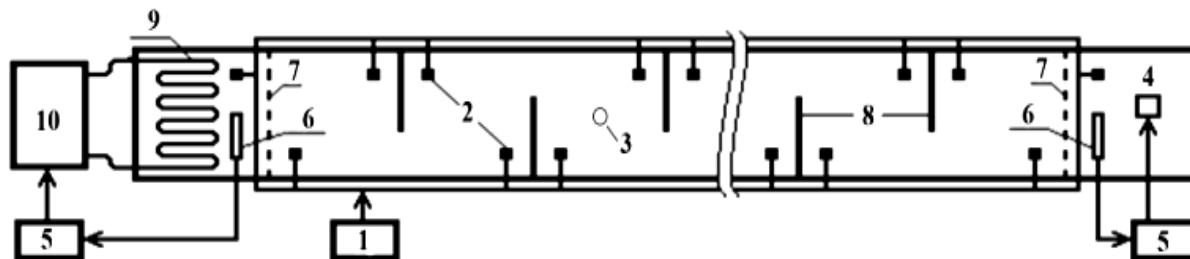


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для определения избираемой и окончательно избираемой температуры у молоди рыб.

1 — компрессор, 2 — распылитель, 3 — термометр (электронный датчик), 4 — нагреватель, 5 — терморегулятор, 6 — датчик температуры, 7 — сетка-ограждение, 8 — неполные перегородки между отсеками, 9 — теплообменник, 10 — холодильный агрегат.

Опыты проводили в 2–3-кратной повторности, их результаты суммировались. Распределение рыб, а также избираемую ими температуру на начальном этапе выбора обычно фиксировали 8–10 раз в светлое время суток с интервалом в 1–1.5 ч. За величину ИТ принимали температуру в отсеке, в котором находилась каждая особь в момент снятия показаний. Данные за каждые сутки опыта суммировали и делили на число наблюдений (для 10 рыб число наблюдений за сутки составляло от 80 до 100), получая средние значения ИТ. Если в течение 3-х суток и более средние значения ИТ достоверно не различались, эту температуру принимали за значение ОИТ, характеризующее зону стабильного выбора (Голованов, 2013а, б). Рыб в опыте кормили 1–2 раза в сутки. Корм размещали в один или несколько отсеков, в которых на момент наблюдения находились рыбы. В общей сложности исследовано 278 экз. сеголетков, двухлетков, трехлетков и четырехлетков рыб. Размер исследованных рыб, который не превышал 10–12 см, был ограничен размерами экспериментальных термоградиентных установок. При определении ВЛТ использован метод КТМ (при скорости нагрева воды 9°C/ч) и ХЛМ (Becker, Genoway, 1979; Beitinger et al., 2000; Голованов и др., 2012; Голованов, 2013а, б). Схемы экспериментальных установок по определению значений ВЛТ (в том числе КТМ, ЛТ и ХЛМ) приведены на рис. 2.

Для определения КТМ и ЛТ группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации (рис. 2а). Температуру воды в опытном аквариуме повышали со скоростью 9°C/ч до нарушения локомоторной функции рыб — переворота на бок или кверху брюшком, сублетальное значение температуры фиксировали как КТМ. При этом в случае прекращения температурного воздействия и переноса в рыб в воду с температурой на 3–4°C ниже они сохраняли жизнеспособность. При продолжении нагрева до момента прекращения движения жаберных крышек фиксировали значение ЛТ по этому показателю.

Для определения ХЛМ группу рыб (по 6 экз. в каждой, две повторности) также помещали в экспериментальный аквариум объемом 60 л, оборудованный системой нагрева и аэрации (рис. 2б). Однако температуру воды в этом случае повышали со скоростью 0.04°C/ч (1°C/сут) до момента гибели рыб, именно эту температуру и фиксировали как значение ХЛМ. На каждые 4-ые сутки меняли половину объема воды в аквариуме, сохраняя при этом ее температуру. Продолжительность эксперимента при медленной скорости нагрева воды составляла 16–23 сут, при скорости нагрева 9°C — 1.5–1.8 ч. Все опыты проводили в условиях естественного фотопериода. Рыб (только в опытах по определению ХЛМ) кормили 1 раз в сутки живым зоопланктоном, рыбным фаршем, сухим комбикормом (а щук — и сеголетками окуня) в объеме 5–10% от общей массы тела. В общей сложности исследовано 9 видов рыб из 4 семейств. Опыты проводили в 2-кратной повторности, их результаты суммировались. Всего исследовано 228 рыб.

Все данные обработаны статистически с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 5.1 и Excel 2003. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm m$) или в виде средних значений. Ошибка среднего значения ОИТ не превышала 0.3°C у всех видов, за исключением бычка-головача. Поскольку методические разработки А.М. Свирского и В.Г. Терещенко (1992) и анализ многолетних данных (Голованов, 2013а, б) показали, что ошибка определения ОИТ у группы

особей в горизонтальных термоградиентных установках с учётом всех методических погрешностей составляет $\pm 1^\circ\text{C}$, различия показателей, превышающие 1°C , считались достоверными. При определении КТМ, ЛТ и ХЛМ использованы методические разработки В.А. Соколова (1988), показавшие, что ошибка определения различных показателей ВЛТ, включая характеристики, КТМ, ЛТ и ХЛМ, у группы особей с учётом всех методических погрешностей составляет $\pm 1^\circ\text{C}$. Таким образом, различия показателей, превышающие 1°C , считались достоверными.

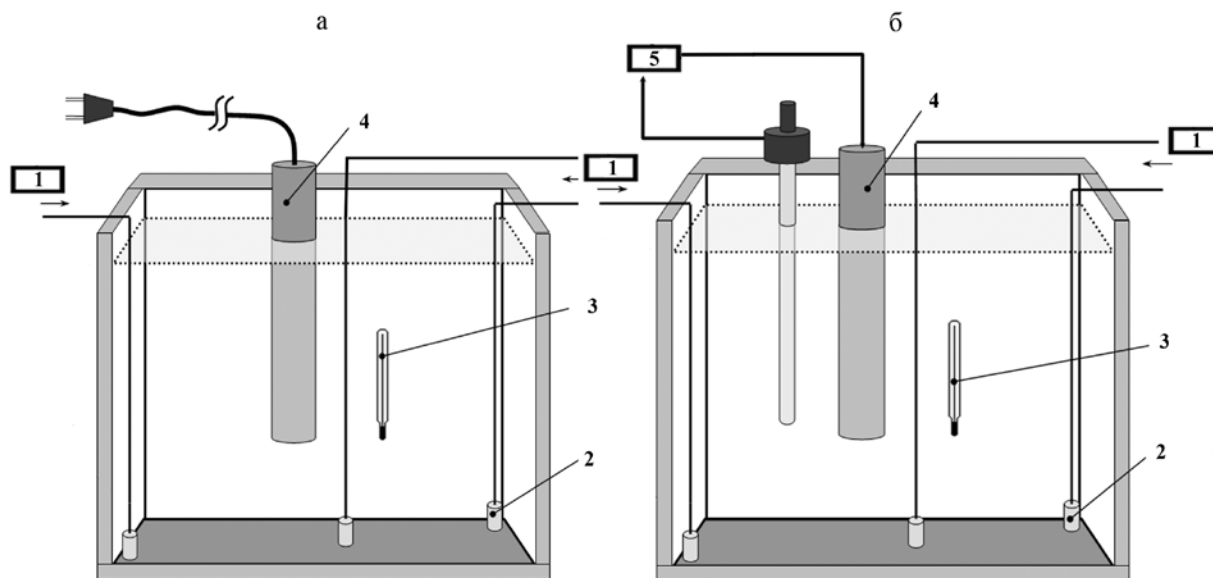


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для определения критического термического максимума и летальной температуры (а) и хронического летального максимума (б) у молоди рыб. 1 — компрессор, 2 — распылитель, 3 — термометр, 4 — нагреватель, 5 — терморегулятор.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Температурный оптимум (окончательно избираемая температура). Между тремя группами показателей или критериев, характеризующих отношение морских и пресноводных рыб к температурному фактору среды, существуют тесная взаимосвязь. Показатели ОТР, ОИТ и ВЛТ высоко коррелируют между собой, что показано на 49 видах морских и пресноводных рыб по данным М. Джоблинга (Jobling, 1981) и подтверждено нашими опытами по термоизбиранию и термоустойчивости у 13 пресноводных видов России, обитающих в регионе Верхней Волги (Голованов, 2013 а, б). Поэтому, значима любая информация даже по одному из вышеприведенных показателей, поскольку это позволяет прогнозировать и другие температурные показатели, как оптимальные, так и пессимальные.

Значения ОИТ, полученные в результате проведенных экспериментов, приведены в табл. 1. Следует отметить тот факт, что температура акклимации всех особей в опытах по определению ИТ и ОИТ соответствует летним и осенним природным условиям водоемов ($14\text{--}22^\circ\text{C}$). Максимальные значения ОИТ отмечены у трех видов — вида-вселенца головешки-ротана, а также серебряного карася и карпа. Большинство карповых видов — уклейка, лещ, плотва, а также речной окунь, вьюн и щука, избирают более низкую ОИТ по сравнению с самыми теплолюбивыми видами. Все вышеуказанные виды представлены сеголетками и годовиками. У более взрослых особей 2-х карповых видов — трехлетков пескаря и четырехлеток обыкновенного голяна, уровень ОИТ существенно ниже по сравнению с теплолюбивыми карповыми, соответственно 20.5 и 16.8°C . По-видимому, более младшие возрастные группы голяна и пескаря будут избирать более высокую (на несколько градусов) температуру в сравнении с взрослыми особями. Вместе с тем, это свидетельствует о том, что даже в пределах одного семейства могут существовать виды, термальные ниши которых существенно различаются.

Двух- и трехлетки видов-вселенцев бычка-цуцика и бычка-головача, а также усатого голяца, избирали относительно низкие значения ОИТ — 22.4 , 22.4 и 15.1°C соответственно. Таким образом, амплитуда полученных значений ОИТ достаточно широка и составляет 15°C : от 15°C — у усатого голяца до 30°C — у головешки-ротана. Обращает на себя внимание высокий уровень ОИТ у головешки-ротана, соизмеримый с таковым у карпа и серебряного карася. Очевидно, столь высокий уровень дает определенные преимущества этому виду-вселенцу по сравнению с обычными видами карповых, широко распространенных в водоемах Верхней Волги — лещом и плотвой, а также с речным окунем в условиях более высокой температуры в летний сезон года.

Таблица 1. Значения окончательно избираемой температуры у исследованных видов рыб.

Вид	Возраст	Сезон года	Температура акклимации, °С	Время выбора зоны ОИТ, сут	Значение ОИТ, °С
Карп (сазан)	0+	Л	18.0	3–5	28.7
Карась серебряный	0+	Л	22.0	3–5	29.2
Лещ	0+1+	Л	18.0 ± 2.0	6–8	26.5
Плотва	0+1+	Л	18.0 ± 2.0	6–8	26.0
Уклейка	0+	О	16.0	6–8	27.2
Пескарь	2+	Л, О	18.0	3–6	20.5
Обыкновенный голянь	3+	О	14.0	3–5	16.8
Головешка-ротан	0+	Л	19.0	3–5	30.0
Речной окунь	0+	Л	16.0	6–8	26.4
Вьюн	1+	Л, О	17.0	4–7	25.0
Обыкновенная щука	0+	Л	21.0	4–8	24.3
Усатый голец	2+, 3+	Л	18.0	4–6	15.1
Бычок-цуцик	2+, 3+	Л	18.0	2–6	22.4
Бычок-головач	2+, 3+	О	18.0	2–6	22.4

Примечание. Л — лето, О — осень.

Эксперименты по термоизбиранию, проведенные с усатым голянцем и пескарем на двух различных по размерам и конструктивным особенностям (наличие перегородок или их отсутствие и др.) установках, показали практически идентичные результаты. Это подтверждает ранее сделанное предположение о том, что выбор ОИТ в градиенте температуры происходит независимо от типа градиентной установки (Голованов, 2012; Голованов, 2013а, б).

Поведение рыб в градиенте температуры у разных видов несколько отличалось. Для карпа, леща, плотвы и уклейки, а также речного окуня, более характерным был выбор температуры группой, в которой были все особи. В то же время, головешка-ротан, пескарь, голянь обыкновенный, вьюн, щука, усатый голец и оба вида бычков также избирали температуру, однако чаще это происходило или в составе группы из 1–3 особей, или индивидуально. Несмотря на разницу в поведении, время выхода на стабильный уровень ОИТ после 2-3 суток нахождения в градиенте температуры было примерно одинаковым у наиболее теплолюбивых видов — карпа, серебряного карася и головешки-ротана, а также у предпочитавших более низкую ОИТ — пескаря, голяня обыкновенного, бычка-цуцика и бычка-головача. Время выхода на стабильный участок термоизбирания также характеризует адаптационные возможности рыб, однако достаточно сильно варьирует в зависимости от предварительной температуры акклимации, сезона года и возраста рыб, а также их исходного физиолого-биохимического статуса.

Как известно, значение ОИТ $\pm 2^\circ\text{C}$, принято считать величиной термальной ниши для каждого конкретного вида рыб (Hokanson, 1977; Reynolds, Casterlin, 1978, 1979; Magnuson et al., 1979; Golovanov, 2006). Таким образом, термальные ниши исследованных 14-и видов рыб из 7-и семейств в общем диапазоне температуры жизнедеятельности пресноводных рыб представлены амплитудой значений от 13 до 32°C. Обращают на себя внимание низкие значения ОИТ усатого гольца и обыкновенного голяня, близкие по абсолютному значению к ОИТ у лососевых и сиговых видов рыб. Совпадение или близость термальных ниш означает возможность конкуренции рыб, по крайней мере, за «термальный ресурс» биотопа в водоеме. Очевидно, что как в экспериментальных, так и особенно в естественных условиях, при наличии или отсутствии корма и хищников, распределение и поведение рыб будет варьировать достаточно сильно (Magnuson et al., 1979; Смирнов, Голованов, 2011; Голованов, Базаров, 2012; Голованов, 2013а, б; Смирнов, Смирнова, 2015). Значения ОИТ, полученные для различных видов рыб, могут быть использованы в качестве исходных величин, характеризующих оптимальные или близкие к оптимальным температурные условия жизнедеятельности.

Температурный пессимум (верхняя летальная температура). Наибольшие значения КТМ и ЛТ у исследованных видов при акклимации к температуре летнего сезона (18–20°C) зафиксированы у серебряного карася и карпа (табл. 2). У головешки-ротана и уклейки значения ВЛТ были несколько меньше. У молоди синца и щуки величины КТМ оказались равны, но меньше, чем у наиболее теплолюбивых рыб. Еще ниже был показатель у сеголеток плотвы и окуня. Самые низкие значения КТМ и ЛТ из числа исследованных нами представителей эвритермных видов рыб, продемонстрировали особи пескаря.

Значения показателей ХЛМ, в отличие от КТМ, были выше у карпа (41.3°C) в сравнении с се-

ребрянным карасем (39.5°C). У молоди уклейки, щуки, плотвы и леща значения ХЛМ близки и составили 36.9, 35.5, 36.3 и 37.0°C соответственно. У молоди головешки-ротана в разные сезоны года уровень ХЛМ составил 35.8–36.2°C. Более высокие значения ВЛТ, определенные методом ХЛМ, связаны с процессом температурной переакклимацией рыб в течение 16–23 суток эксперимента. Более высокие скорости нагрева (4–42°C/ч) в течение 1.5–1.8 ч не позволяют рыбам адаптироваться к меняющимся условиям среды, поэтому значения КТМ и ЛТ у одного и того же вида рыб ниже, чем ХЛМ.

Таблица 2. Термоустойчивость молоди разных видов рыб в летний сезон года.

Вид	КТМ, °С	ЛТ, °С
Карп	35.6 ± 0.1	36.5 ± 0.2
Серебряный карась	37.9 ± 0.1	38.1 ± 0.1
Лещ	33.7 ± 0.2	35.2 ± 0.3
Плотва	33.3 ± 0.3	34.5 ± 0.2
Уклея	33.6 ± 0.2	36.0 ± 0.3
Синец	33.0 ± 0.1	35.4 ± 0.5
Пескарь	32.2 ± 0.1	33.0 ± 0.3
Головешка-ротан	34.8 ± 0.2	36.4 ± 0.2
Речной окунь	32.0 ± 0.1	33.4 ± 0.2
Обыкновенная щука	33.6 ± 0.1	35.2 ± 0.2

Примечание. * — температура акклимации 18–20°C.

Было выяснено также, что термоустойчивость молоди рыб напрямую зависит от температуры акклимации. У всех исследованных видов рыб отмечен достоверный рост значений КТМ и ЛТ с повышением температуры акклимации (табл. 3).

Таблица 3. Летальные температуры молоди рыб в широком диапазоне температур акклимации.

Температура акклимации, °С	Вид			
	Карп	Серебряный карась	Головешка-ротан	Обыкновенная щука
	КТМ (при скорости нагрева 9°C/ч)			
4	26.5	28.5	28.9	28.7
13	31.8	32.1	30.0	30.1
20	35.6	37.9	34.8	33.6
28	39.7	40.4	37.6	**
32	41.4	41.4	38.8	**
	ЛТ (при скорости нагрева 9°C/ч)			
4	28.3	30.0	30.9	29.7
13	33.6	33.0	32.2	30.5
20	36.5	38.1	36.4	35.2
28	40.5	41.0	38.2	**
32	42.0	41.7	39.1	**
	ХЛМ (при скорости нагрева 1-2°C/сутки)			
20	41.3	39.0	36.0	34.0

Примечание: * — ошибка среднего 0.1–0.3; ** — гибель особей при акклимации.

Сравнение величин КТМ и ЛТ у исследованных видов выявило уменьшение разницы между значениями ЛТ и КТМ с ростом температуры акклимации. Наибольшая разница между уровнем КТМ в широком диапазоне уровней акклимации выявлена у карпа в диапазоне повышения температуры акклимации от 4 до 13°C, у серебряного карася и головешки-ротана в диапазонах повышения температуры от 13 до 20°C.

Таким образом, определены значения ОИТ у 14-и видов рыб из 7-и семейств в летне-осенний период при исходной температуре акклимации рыб от 14 до 22°C. Минимальное значение ОИТ выявлено у 3-4-летков усатого гольца — 15.1°C, максимальное у сеголетков головешки-ротана — 30.0°C. Близкие значения ОИТ показаны для серебряного карася — 29.2°C и карпа — 28.7°C. Установлены показатели ОИТ у трех видов-вселенцев: головешки-ротана (30.0°C), а также у двух видов бычков — головача и цуцика (22.4°C). Рассмотрены особенности терморегуляционного поведения молоди и более взрослых рыб в условиях температурного градиента среды. Полученные данные могут быть использованы в качестве показателей, характеризующих оптимальные или близкие к оптимальным температурные условия жизнедеятельности рыб из различных возрастных групп.

Определены значения ВЛТ методами КТМ и ХЛМ у 9 видов рыб из 4 семейств. Максимальные значения ВЛТ отмечены у карпа и серебряного карася. Выявлено повышение значений КТМ вплоть до значений ВЛТ, полученных методом ХЛМ, при условии высокой температуры акклимации у 4-х видов рыб – серебряного карася, карпа, головешки-ротана и щуки. Полученные данные также могут быть использованы в качестве показателей, характеризующих pessимальные температурные условия жизнедеятельности молоди рыб.

Соотношение показателей эколого-физиологического оптимума и верхней температурной границы жизнедеятельности видов рыб. Для сравнения с полученными выше данными привлечены материалы более ранних опытов (7 семейств, 18 видов): сем. CYPRINIDAE (*Blicca bjoerkna* Linnaeus, 1758 — густера; *Carassius carassius* Linnaeus, 1758 — золотой карась; *Leuciscus idus* Linnaeus, 1758 — язь; *Rhodeus sericeus amarus* Bloch, 1782 — обыкновенный горчак; *Scardinius erythrophthalmus* Linnaeus, 1758 — краснопёрка; *Tinca tinca* Linnaeus, 1758 — линь); сем. COBITIDAE (*Cobitis taenia* Linnaeus, 1758 — обыкновенная щиповка); сем. SILURIDAE (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758 — обыкновенный сом); сем. LOTIDAE (*Lota lota* Linnaeus, 1758 — налим); сем. PERCIDAE (*Gymnocephallus cernuus* Linnaeus, 1758 — обыкновенный ёрш; *Sander lucioperca* Linnaeus, 1758 — обыкновенный судак).

Данные для представителей четырех других семейств приведены в качестве сравнения. В их числе: сем. CLUPEIDAE (*Clupeonella cultriventris caspia* Svetovidov, 1914 — каспийская тюлька); сем. ACIPENSERIDAE (*Acipenser baerii* Brandt, 1869 — сибирский осетр; *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 — стерлядь); сем. SALMONIDAE – Лососевые (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss* — радужная форель); сем. COREGONIDAE – Сиговые (*Coregonus peled* Gmelin, 1789 — пелядь); сем. OSMERIDAE (*Osmerus eperlanus* Linnaeus, 1758 — европейская корюшка или снеток).

В настоящее время различий между характеристиками ОИТ и ВЛТ, ВЛТ экспериментально полученными для рыб, обитающих в разных частях своего ареала (в центре, на севере или юге) не обнаружено, несмотря на ряд внутривидовых отличий в термоадаптационных реакциях (Голованов, 1996; Beitinger et al., 2000). На основании этого, значения ОИТ и (ХЛМ или КТМ), полученные экспериментально в идентичных условиях, можно считать видовыми признаками и использовать для сравнительного анализа. В табл. 4 приведены температурные показатели эколого-физиологического оптимума и верхней границы жизнедеятельности 32 вида рыб, как полученные ранее, так и определенные впервые.

Судя по данным табл. 4, температурный эколого-физиологический оптимум (ЭФО) у большинства видов рыб расположен в диапазоне от 20 до 31°C. Минимальные значения отмечены: у пескаря (20.5°C), у обыкновенного горчака (20.4°C), у обыкновенного гольяна (16.8°C), а также у трех холодолюбивых видов рыб — налима (15.0°C), радужной форели (15.5°C), пеляди (17.0°C) и корюшки (12.5°C). В пределах семейства карповых наблюдается большое разнообразие термальных ниш, от 16.8°C у горчака до 30°C у карпа и головешки-ротана, а также ~31°C у обыкновенного сома. Следует учитывать, что под термальной нишей рыб подразумевается зона ОИТ ± 2°C (Magnuson et al., 1979).

Последние три вида можно считать наиболее теплолюбивыми из числа обитающих на территории Европейской части России. Чуть менее теплолюбивы два вида карасей. Вьюн и щука, а также виды из семейств окуневых, бычковых и осетровых, имеют ЭФО, которые по величине несколько меньше, чем у теплолюбивых видов карповых — уклейки, густеры, леща, плотвы и язя.

Значения ХЛМ исследованных видов рыб, как правило, на 10–15°C выше оптимальных. Наиболее термоустойчивы, судя по ХЛМ, сом (~40.5°C), карп (39.5°C), золотой карась (38.5°C), щиповка (38.4°C), головешка-ротан (38.0°C) и серебряный карась (37.7°C). Минимальные значения ХЛМ отмечены у обыкновенного гольяна (31.5°C), обыкновенного горчака (31.0°C), усатого гольца (29.5°C), бычков кругляка и цуцика (~30.0°C), а также у холодолюбивых рыб — пеляди (31.0°C), налима (29.0°C), радужной форели (27.5°C) и корюшки (26.5°C). Диапазон значений ХЛМ в пределах изученных видов карповых достаточно широк — от 31 до 40.5°C. Следует отметить, что для большинства видов верхняя температурная граница жизнедеятельности расположена в диапазоне от 29–30 до 40–41 °C. Эти результаты подтверждают вывод о том, что самые теплолюбивые виды, обитающие в данных регионах и в целом, на Европейской части России — это сом, сазан (карп), серебряный и золотой караси, а также головешка-ротан.

В случае дальнейшего потепления климата многие теплолюбивые виды рыб из перечисленных выше не испытывают особых проблем. У них, как показывают приведенные данные, существует определенный «температурный запас прочности» в несколько градусов. Это связано с тем, что большинство видов, обитающих в северо-западных и центральных регионах Европейской части России, существуют в условиях температуры на несколько градусов ниже значений их ЭФО. Для холодолюбивых видов (налим, радужная форель, пелядь, корюшка) повышение среднегодовой температуры на не-

сколько градусов может представлять определенную угрозу. Гораздо более опасными для всех видов являются случаи аномального повышения температуры в летний сезон года, аналогично тому, как это произошло летом 2010 г. Так, в пределах Рыбинского водохранилища отмечались случаи гибели ерша и окуня. Температура в прибрежье водохранилища поднималась до сублетального уровня 30–35°C, который, при определенных условиях в любом водоеме — озере или реке, например, дефиците кислорода в воде, вполне может привести к массовой гибели рыб.

Таблица 4. Температурные показатели эколого-физиологического оптимума и верхней границы жизнедеятельности некоторых видов рыб.

Вид	Возраст	ОИТ, °С	ВЛТ (по ХЛМ), °С
Обыкновенная щука	0+	24.3	35.5
Карп (сазан)	0+, 1+	30.0	39.5
Синец	0+, 1+	27.3	37.0
Лещ	0+, 1+	26.5	36.3
Уклейка	0+	27.0	37.0
Густера	0+, 1+	27.0	~36.8
Серебряный карась	0+, 1+	27.5	37.7
Золотой карась	0+, 1+	28.5	38.5
Пескарь	2+	20.5	~33.0
Язь	0+, 1+	25.8	~35.5
Обыкновенный голяк	3+	16.8	31.5
Обыкновенный горчак	2+, 3+	20.4	~31.0
Плотва	0+, 1+	26.0	36.3
Красноперка	3+	24.0	~35.0
Линь	1+, 2+	26.8	36.8
Усатый голец	2+, 3+	15.1	~29.5
Обыкновенная щиповка	2+, 3+	27.5	38.4
Вьюн	1+	25.0	35.5
Обыкновенный сом	1+, 2+	~31.0	~40.5
Налим	0+	15.0	29.0
Обыкновенный ерш	0+, 1+	24.8	~34.2
Речной окунь	0+, 1+	25.7	34.8
Обыкновенный судак	0+, 1+	24.0	~34.0
Головешка-ротан	0+, 1+	30.0	38.0
Бычок-кругляк	1+, 2+	22.5	~30.0
Бычок-цуцик	1+, 2+	22.5	~30.0
Каспийская тюлька	1+, 2+	~27.5	~37.0
Сибирский осетр	0+	22.5	32.0
Стерлядь	0+	23.6	32.8
Радужная форель	0+	15.5	27.5
Песядь	0+	17.0	31.0
Европейская корюшка	0+, 1+	12.5	26.5

Примечание: 0+, 1+, 2+, 3+ – возраст рыб; ~ – данные единичных опытов или экспертная оценка; для видов, у которых возраст рыб от 2+ и выше, данные по ОИТ и ВЛТ для сеголетков и годовиков предположительно будут на 1-2°C выше.

Рост температуры воды в Рыбинском водохранилище летом и осенью 1997–2010 гг. (Литвинов, Законнова, 2012), по всей видимости, способствовал вселению и натурализации каспийской тюльки. Тюлька заняла экологическую нишу корюшки, практически исчезнувшей из Рыбинского водохранилища в начале XXI века вследствие относительно высоких значений температуры воды летом. Верхняя граница обитания корюшки расположена на уровне ~27–28°C, что частично объясняет резкое уменьшение ее численности и практически полное исчезновение.

Экспериментальные данные, характеризующие термоизбирание (или терморегуляционное поведение) рыб (ОИТ) и их верхнюю границу термоустойчивости (КТМ и ХЛМ), применимы для классификации рыб по отношению к температурному фактору среды. Такие классификации были разработаны ранее рядом авторов (Дрягин, 1973; Никаноров, 1976; Hokanson, 1977), а обзор предложенных классификаций был выполнен нами ранее (Голованов, 2013а, б). Все указанные классификации вполне могут быть использованы для предварительной оценки термоадаптационных возможностей пресноводных рыб в естественных условиях и в аквакультуре. Для разделения рыб, обитающих в ос-

новном в пресноводных водоёмах северо-запада России, по отношению к температурному фактору нами предложено использовать три показателя — ОИТ, ХЛМ и температурный диапазон жизнедеятельности. Виды рыб, для которых существуют такие данные, можно объединить в четыре группы. В приведенной ниже табл. 5, в отличие от ранее опубликованных данных (Голованов, 2013а, б), уточнены некоторые количественные показатели и добавлены новые виды.

Понятно, что к этим данным следует относиться как к предварительным. В перспективе они могут быть изменены и дополнены новыми экспериментальными данными. Тем не менее, они количественно отражают степень теплолюбивости и холодолюбивости рыб, особенности их эври- и стенотермии, а также указывают на примерное расположение термальных ниш у различных видов рыб на температурной шкале их жизнедеятельности. Кроме того, данные позволяют судить о температурных возможностях отдельных семейств у рыб. Так, температурные показатели жизнедеятельности осетровых несколько отличаются от обычных карповых и окуневых. В то же время у холодолюбивых (лососевые, сиговые, налимовые, корюшковые) видов температурные оптимумы и границы жизнедеятельности существенно ниже в сравнении с теплолюбивыми (карповые, окуневые, сельдевые и осетровые) видами. Весьма характерно, что экспериментальные данные по определению показателей эколого-физиологического оптимума (ОИТ) и пессимума (ВЛТ, в том числе КТМ, ЛТ и ХЛМ), получаемые на протяжении многих лет (в период с 1974 г. и по настоящее время), довольно близки.

Таблица 5. Классификация рыб по отношению к температурному фактору среды (уточненные данные).

Группы видов	Температурные показатели жизнедеятельности рыб	Виды рыб
Наиболее теплолюбивые	ВЛТ (ХЛМ) 37–41°C, ОИТ 28–31°C, температурный диапазон жизнедеятельности 0–41°C	Карп, сом, серебряный карась, золотой карась, головешка-ротан, обыкновенная щиповка
Теплолюбивые	ВЛТ (ХЛМ) 35–37°C, ОИТ – 25–28°C, температурный диапазон жизнедеятельности 0–37°C	Лещ, уклейка, синец, густера, плотва, язь, красноперка, линь, каспийская тюлька, окунь, судак, ёрш, вьюн
Умеренно теплолюбивые	ВЛТ(ХЛМ) 31–35°C, ОИТ 20–25°C, температурный диапазон жизнедеятельности 0–35°C	Обыкновенный горчак, щука, сибирский осётр, стерлядь, пескарь, бычок-цуцик, бычок-головач
Холодолюбивые	ВЛТ(ХЛМ) 25–31°C, ОИТ 13–18°C, температурный диапазон жизнедеятельности 0–31°C	Сёмга атлантическая, кумжа, пелядь, корюшка, налим, голян обыкновенный, усатый голец

Сравнение результатов, приведенных в таблицах 2, 3 (с 2004 по 2015 гг.) и 4 (с 1974 по 2003 гг.), показывает 95% совпадение характеристик ОИТ и ВЛТ у рыб. Несколько отличаются только показатели ОИТ у карпа (28.7 и 30.0°C) и серебряного карася (29.2 и 27.5°C), с учетом общей ошибки метода, равной $\pm 1^\circ\text{C}$, несовпадение следует признать удовлетворительным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение термоадаптаций рыб, их окончательно избираемой температуры как аналога температурного оптимума роста и развития, а также той зоны температуры, которая может при определенных ситуациях привести к летальному исходу, важно не только в теоретическом аспекте. Такие количественные показатели как ОИТ и ВЛТ (КТМ и ХЛМ) позволяют не только проводить экспертную оценку условий существования рыб, но и прогнозировать особенности их роста, развития, воспроизводства, поведения и распределения в термально неоднородной среде.

Исследование выполнено при поддержке Программы фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН “Динамика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий” и Программ Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-719.2012.4 и НШ-2666.2014.4 “Экологические аспекты адаптаций и популяционная организация у рыб”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голованов В. К. Эколого-физиологические закономерности распределения и поведения пресноводных рыб в термоградиентных условиях // *Вопр. ихтиологии*. 2013б. Т. 53, № 3. С. 286–314. [Golovanov V.K. Ecophysiological patterns of distribution and behavior of freshwater fish in thermal gradients // *J. Ichthyology*. 2013b. Vol. 53. No. 4. P. 252–280. DOI: 10.1134/S0032945213030016]. In Russian.
- Голованов В.К. Температурные критерии жизнедеятельности пресноводных рыб. М.: Полиграф-Плюс, 2013а. 300 с. Golovanov V. K. *Temperaturnye kriterii zhiznedeiatel'nosti presnovodnykh ryb*. М.: Poligraf-Plus Publ., 2013а. 300 s. [Golovanov V.K. *Temperature criteria of the life activity of freshwater fish*. Moscow: POLIGRAF-PLUS, 2013. 300 p.] In Russian.

- Голованов В.К., Базаров М.И. Влияние продолжительных периодов голодания на термоизбирание у молоди леща в различные сезоны года // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. 2012. № 2. С. 28–32. Golovanov V.K., Bazarov M.I. Vlijanie prodolzhitel'nyh periodov golodaniya na termoizbiranie u molodi leshha v razlichnye sezony goda // Vestnik AGTU. Serija: Rybnoe hozjajstvo. 2012. № 2. S. 28–32. [Golovanov V.K., Bazarov, M.I. Effect of prolonged periods of fasting on thermoizbiranie in young bream in different seasons // Herald ASTU. Series: Fisheries. 2012. No. 2. P. 28–32.] In Russian.
- Голованов В.К., Вербицкий В.Б., Капшай Д.С., Маврин А.С., Власова И.А. Особенности термоизбирания некоторых видов рыб, обитающих в водоемах Верхней Волги // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. 2013. № 3. С. 91–97. Golovanov V.K., Verbickij V.B., Kapshaj D.S., Mavrin A.S., Vlasova I.A. Osobennosti termoizbiraniya nekotoryh vidov ryb, obitajushhih v vodoemah Verhnej Volgi // Vestnik AGTU. Serija: Rybnoe hozjajstvo. 2013. № 3. S. 91–97. [Golovanov V.K., Verbitsky V.B., Kapshai D.S., Mavrin A.S., Vlasova I.A. Features thermoizbiraniya of some fishspecies living in waters of the Upper Volga // Herald ASTU. Series: Fisheries. 2013. N 3. P. 91–97.] In Russian.
- Голованов В.К., Свирский А.М., Извеков Е.И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль: ЯрГТУ, 1997. С. 92–116. Golovanov V.K., Svirskij A.M., Izvekov E.I. Temperaturnye trebovaniya ryb Rybinskogo vodohranilishcha i ih realizacija v estestvennyh uslovijah // Sovremennoe sostojanie rybnih zapasov Rybinskogo vodohranilishcha. Jaroslavl': JarGTU, 1997. S. 92–116. [Golovanov V.K., Svirsky A.M., Izvekov E.I. Temperature requirements of fish from the Rybinsk reservoir and their implementation of natural conditions // The current state of fish stocks in the Rybinsk reservoir. Yaroslavl: YarGTU, 1997. P. 92–116.] In Russian.
- Голованов В.К., Смирнов А.К., Капшай Д.С. Сравнительный анализ окончательно избираемой и верхней летальной температуры у молоди некоторых видов пресноводных рыб // Труды Карел. НЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2012. № 2. С. 70–75. Golovanov V.K., Smirnov A.K., Kapshaj D.S. Sravnitel'nyj analiz okonchatel'no izbiraemoj i verhnej le-tal'noj temperatury u molodi nekotoryh vidov presnovodnyh ryb // Trudy Karel. NC RAN. Ser. Jekspe-rim. biologija. 2012. № 2. S. 70–75. [Golovanov V.K., Smirnov A.K., Kapshai D.S. Comparative analysis of the final selected temperature and the upper lethal temperature in the young of some species of freshwater fish // Proceedings of Karel. SC RAS. Ser. Experimental. biol. 2012. N 2. P. 70–75.] In Russian.
- Дрягин П.А. Экологическая классификация рыб по температурному фактору // Лимнология Сев.-Запада СССР. I. А–И. Таллин: АН ЭССР, 1973. С. 167–170. Dryagin P. A. Ekologicheskaja klassifikacija ryb po temperaturnomu faktoru // Limnologija Sev.-Zapada. I. A–I. Tallin: AN SSSR, 1973. S. 167–170. [Dryagin, P.A. Environmental classification of fish on temperature factor // Limnology North-West of the USSR. I. A-I. Tallinn: AS ESSR, 1973. P. 167–170.] In Russian.
- Вербицкий В.Б. Температурный оптимум, термопреферендум и термотолерантность пресноводных ракообразных (Cladocera, Isopoda, Amphipoda). Автореф. дисс.... докт. биол. наук. Борок, 2012. 48 с. Verbickij V.B. Temperaturnyj optimum, termopreferendum i termotolerantnost' presnovodnyh rakoobraznyh (Cladocera, Isopoda, Amphipoda). Avtoref. diss.... dokt. biol. nauk. Borok, 2012. 48 s. [Verbitsky VB The temperature optimum, termopreferendum, thermotolerance of freshwater crustaceans (Cladocera, Isopoda, Amphipoda). Thesis of Doctor. Biol. Sciences. Borok, 2012. 48 p.] In Russian.
- Ивлев В.С. Методы определения избираемой температуры // Руководство по методике исследований физиологии рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 344–353. Ivlev V.S. Metody opredelenija izbiraemoj temperatury // Rukovodstvo po metodike issledovanij fiziologii ryb. M.: Izd-vo AN SSSR, 1962. S. 344–353. [Ivlev V.S. Methods for determining of the selected temperature // Guide on methodology of fish physiology research. M.: Publishing House of the USSR Academy of Sciences, 1962. P. 344–353.] In Russian.
- Литвинов А.С., Законнова А.В. Термический режим Рыбинского водохранилища при глобальном потеплении // Метеорология и гидрология. 2012. № 9. С. 91–96. Litvinov A.S., Zakonnova A.V. Termicheskij rezhim Rybinskogo vodohranilishha pri global'nom poteplenii // Meteorologija i gidrologija. 2012. № 9. S. 91–96. [Litvinov A.S., Zakonnova A.V. The thermal regime of the Rybinsk reservoir in the global warming // Meteorology and Hydrology. 2012. N 9. P. 91–96.] In Russian.
- Никаноров Ю.И. Экологические условия формирования ихтиофауны и прогнозирование ее состава в водохранилищах-охладителях тепловых электростанций // Водн. ресурсы. 1976. № 3. С. 114–123. Nikanorov Ju.I. Jekologicheskie uslovija formirovanija ihtiofauny i prognozirovanie ee sostava v vodohranilishhah-ohladeljah teplovyh jelektrostantsij // Vodn. resursy. 1976. № 3. S. 114–123. [Nikanorov Yu.I. Environmental conditions of formation of fish fauna and forecasting of its membership in the cooling reservoir of thermal power plants // Water Resources. 1976. No. 3. P. 114–123.] In Russian.
- Свирский А.М., Терещенко В.Г. Точность определения температуры, избираемой рыбами в установке с горизонтальным термоградиентом // Биол. внутр. вод. Информ. бюл. Л., 1992. № 92. С. 85–88. Svirskij A.M., Tereshhenko V.G. Tochnost' opredelenija temperatury, izbiraemoj rybami v ustanovke s gorizontal'nyim termogradientom // Biol. vnutr. vod. Inform. bjul. L., 1992. № 92. S. 85–88. [Svirsky A.M., Tereshchenko V.G. The accuracy of determining on the temperature, what the fish selected to install a horizontal thermal gradient // Biol. Inland. Waters. Inform. Bull. L., 1992. No. 92. P. 85–88.] In Russian.
- Смирнов А.К., Голованов В.К. Распределение речного окуня *Perca fluviatilis* L. в термоградиентных условиях в зависимости от местоположения корма // Вопр. рыболовства. 2011. Т. 12. № 4(48). С. 730–740. Smirnov A.K., Golovanov V.K. Raspredelenie rechnogo okunja *Perca fluviatilis* L. v termogradientnyh uslovijah v zavisimosti ot

- mestopolozhenija korma // Vopr. rybolovstva. 2011. T. 12. № 4(48). S. 730–740. [Smirnov A.K., Golovanov V.K. Distribution of the perch *Perca fluviatilis* L. in thermogradient conditions in dependence on the location of the feed // Problems of Fisheries. 2011. Vol. 12. No. 4(48). P. 730–740.] In Russian.
- Смирнов А.К., Смирнова Е.С. Реакция молоди плотвы *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) на неоднородность кормовых ресурсов в температурном градиенте // Вестник АГТУ. 2015. № 3. С. 44–52. Smirnov A.K., Smirnova E.S. Reaktsiya molodi plotvy *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) na neodnorodnost' kormovykh resursov v temperaturnom gradiente // Vestnik AGTU. 2015. № 3. S. 44–52. [Smirnov A.K., Smirnova E.S. Reaction of the juvenile roach *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) on the heterogeneity of food resources in the temperature gradient // Herald ASTU. 2015. No. 3. P. 44–52.] In Russian.
- Соколов В.А. Оценка точности определения летальных температур рыб методом критического термического максимума КТМ. Институт биологии внутренних вод АН СССР. Борок. 1988. 24 с. Деп. в ВИНТИ. 08.12.1988. № 8697-B88. Sokolov V.A. Otsenka tochnosti opredelenija letal'nykh temperatur ryb metodom kriticheskogo termicheskogo maksimuma KTM. Institut biologii vnutrennikh vod AN SSSR. Borok. 1988. 24 s. Dep. v VINITI. 08.12.1988. № 8697-V88. [Sokolov V.A. Estimation of accuracy of the determination for fish lethal temperatures by the method of critical thermal maximum KTM. Institute of Biology of Inland Waters of the USSR. Borok. 1988. 24 p. Dep. VINITI. 08.12.1988. No. 8697-V88.] In Russian.
- Alabaster J.S., Lloyd R. Water quality criteria for freshwater fish. London–Boston–Sydney–Wellington–Durban–Totonto: FAO and Butterworth Scientific., 1980. 344 p.
- Becker C.D., Genoway R.G. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish // Environ. Biol. Fish. 1979. Vol. 4. No. 3. P. 245–256.
- Beitinger T.L., Bennet W., McCauley R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature // Environ. Biol. Fish. 2000. Vol. 58. No. 3. P. 237–275.
- Cherry D.S., Cairns J.Jr. Biological monitoring. Part V. Preference and avoidance studies // Water Res. 1982. Vol. 16. No. 3. P. 263–301.
- Golovanov V.K. The ecological and evolutionary aspects of thermoregulation behavior of fish // J. Ichthyology. 2006. Vol. 46. Suppl. 2. P. S180–S187.
- Hokanson K. E. F. Temperature requirements of some percids and adaptations to the seasonal temperature cycle // J. Fish. Res. Bd. Can. 1977. Vol. 34. No. 10. P. 1524–1550.
- Jobling M. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimum growth temperature // J. Fish. Biol. 1981. Vol. 19. No. 4. P. 439–455.
- Magnuson J.J., Crowder L.B., Medvick P.A. Temperature as an ecological resource // Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. Amer. Zool. 1979. Vol. 19. No. 1. P. 331–343.
- Reynolds W.W., Casterlin M.E. Behavioral thermoregulation and the “final preferendum” paradigm // Thermoregulation in ectotherms // Amer. Zool. 1979. Vol. 19. No. 1. P. 211–224.
- Reynolds W.W., Casterlin M.E. Behavioral thermoregulation and the “final preferendum” paradigm // Integr. Compar. Biology. 1979. Vol. 19. No. 1.
- Schmidt-Nielsen K. Animal Physiology. Adaptation and Environment. Cambridge (U.K.): Cambridge University, 1979. 416 p.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE TEMPERATURE OPTIMUM AND UPPER TEMPERATURE LIMIT FOR VITAL ACTIVITY IN THE YOUNG FISH FROM THE WATERBODIES OF THE UPPER VOLGA

V. K. Golovanov, D. S. Kapshay

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: vkgolovan@mail.ru*

Indicators of ecological-physiological optimum (EPHO) and pessimum of the fish were analyzed, including final selected temperature (FST) and the upper lethal temperature (ULT), critical thermal maximum (CTM) and chronic lethal maximum (CLM). Fourteen species of fish from seven families (with acclimation temperature in the range of 14 to 22°C) were studied for summer and autumn seasons. The data on similar indicators in 18 species of fish from other seven families obtained earlier also were involved for the analysis. The classification of fish in relation to the temperature factor environment was done. It was concluded that the case of further warming, many species of thermophilic reenumerated above will not experience any problems. They have, as shown by these data, a certain “temperature safety margin” of a few degrees. This is due to the fact that majority of species in the northwestern and central regions of the European part of Russia are existing in a temperature a few degrees lower than the values of (EPHO). For the cold-loving species (eel, rainbow trout, peled, smelt) increase in mean annual temperature for a few degrees can be a threat. Much more dangerous for all species are abnormal rise in temperature in the summer season of the year, similar to how it happened in the 2010 year. Thermoadaptation study of fish, their FST as the temperature analog of the temperature optimum growth and development, as well as that temperature zone, which may in certain situations lead to death, it is important not only theoretically. Such amounts, indicators were both FST and ULT (CTM and CLM) allow not only to conduct peer review, conditions for existence of fish, but also to predict the characteristics of their growth, development, reproduction, behavior, and distribution of thermal inhomogeneous medium.

Keywords: fish, ambient temperature, ecological-physiological optimum, pessimum, final selected temperature, upper lethal temperature, the critical thermal maximum, chronic lethal maximum, classification, the temperature factor, forecasting.

КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КЕФАЛИ-СИНГИЛЯ (*LIZA AURATA RISSO*) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

А. А. Солдатов^{1,2}, И. А. Парфенова²

¹ ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН
292011 г. Севастополь, просп. Нахимова, 2, e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² ФГАОУ ВО Севастопольский госуниверситет, 299053 г. Севастополь, ул. Университетская 33

Исследован процесс адаптации особей кефали-сингиля (*Liza aurata* Risso) к температуре 5°C на протяжении 46 суток. Контрольная группа рыб содержалась при 15±1°C. Температуру воды в аквариумах понижали со скоростью 0,2°C час⁻¹ от 15 до 5°C. В первые 5 суток после понижения температуры воды в организме кефали отмечали развитие ряда компенсационных реакций: увеличением числа циркулирующих эритроцитов и повышением насыщения крови кислородом, что существенно повышало концентрацию кислорода в крови. Первое было связано с опорожнением кровяных депо (селезенка), второе с облегчением насыщения крови кислородом в виду экзотермичности реакции оксигенации гемоглобина. Величины массопереноса кислорода артериальной и венозной кровью в скелетных мышцах равномерно понижались на протяжении всего периода наблюдений, что определялось ограничением объемного тканевого кровотока. Интенсивность потребления кислорода мышцами уменьшалась на 38 % (p<0.001) и на 41-46 сутки наблюдений составила 0,076±0,003 мл O₂ мин⁻¹ 100 г⁻¹ веса. Обсуждаются причины, лежащие в основе выявленных изменений.

Ключевые слова: гипотермия, скелетные мышцы, массоперенос и утилизация кислорода, гемоглобин, эритроциты, объемный тканевой кровоток, морские рыбы.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из следствий действия гипотермии на организм морских и пресноводных рыб является развитие у них состояния асфиксии, которое в большинстве случаев является летальным. Оно наблюдается при температурах близких к 5°C и затрагивает преимущественно теплолюбивые виды рыб (Куликова и др. 1986; Шекк и др., 1990). Данная реакция в определенной степени парадоксальна, так как развивается при снижении потребности организма в кислороде и повышении его растворимости в воде, тканевых и циркуляционных средах. Анализ причин позволил установить рост содержания лактата в тканях рыб при низких температурах, снижение содержания метаболитов цикла Кребса (оксалоацетата, малата, α-кетоглутарата), уменьшение уровня аденилатов и энергетического заряда тканей (Арсан, 1986а,б; Гулевский и др., 2007; Солдатов, Парфенова, 2009). Это происходило на фоне увеличение числа гипоксических (аноксических) зон в скелетных мышцах (Солдатов, Парфенова, 2009), что в определенной степени было связано с аномальной вазоконстрикцией сосудов микроциркуляторного русла (Солдатов, 2010).

О гипоксическом эффекте гипотермии свидетельствует также факт индукции синтеза в тканях рыб HIF-1 (hypoxia inducible factor) (Heise et al., 2006). Этот фактор ранее был идентифицирован в крови форелей (Soitamo et al., 2001). Установлено, что данный локус генома экспрессируется исключительно гипоксией (Bosworth et al., 2005; Ju et al., 2007), что позволяет допустить существенные изменения кислородного режима, которые претерпевают ткани рыб в условиях низких температур.

В настоящей работе на основе определения кислородной емкости крови и величин объемного тканевого кровотока предпринята попытка оценить процессы массопереноса и утилизации кислорода в скелетных мышцах теплолюбивой кефали-сингиля в условия экспериментальной гипотермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика материала. Работа выполнена на стайном пелагическом виде — кефали-сингиля (*Liza aurata*, Risso). Предварительные наблюдения показали, что у данного вида при температурах близких к 5°C отмечаются явные признаки асфиксии. Использовали взрослых особей обоего пола (длина — 22–27 см, вес — 140–250 г) в состоянии относительного физиологического покоя (стадия зрелости гонад II-III). Рыбу отлавливали при помощи ставного невода и перевозили в аквариальную в пластиковых баках емкостью 60 л с воздушной аэрацией. При транспортировке материала на значительные расстояния использовали полиэтиленовые мешки, атмосферу в которых заполняли чистым кислородом.

После транспортировки животных рассаживали в аквариумы и бассейны объемом 1000-1500 л, которые имели централизованные системы проточности воздушной аэрации и терморегуляции. Плотность посадки составляла 50–80 л на одну особь. Фотопериод — 12 часов день : 12 часов ночь. Температура воды поддерживалась на уровне 15±1°C. В данных условиях рыбу содержали в течение 30–45 суток с целью адаптации и снятия стресса, вызванного отловом и транспортировкой. В этот

период, а также в течение опыта особей кормили фаршем из малоценных видов рыб. Суточный пищевой рацион составлял 6-7% от массы тела. В экспериментах использовали активно питающихся, подвижных особей.

Экспериментальная гипотермия. Эксперименты были выполнены в аквариумах емкостью 1000-1500 л. Контрольную группу рыб содержали при температуре воды $15 \pm 1^\circ\text{C}$. В ходе опыта температуру снижали со скоростью $0,2^\circ\text{C час}^{-1}$ от 15 до 5°C . После этого изучали процесс адаптации к указанным температурам в течение 40-ка суток. Регистрацию показателей, отбор проб крови производили на 1-5, 14-15 и 36-40-е сутки содержания.

Отбор проб крови. Пробы артериальной и венозной крови получали соответственно пункцией дорсальной аорты (*aorta dorsalis*) и хвостовой вены (*vena caudalis*) в шприц под слой вазелинового масла (Houston, 1990). Хвостовая вена несет кровь от группы скелетных мышц расположенных между спинным и хвостовым плавниками и фактически отражает характер метаболических процессов в них. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (Richter, Венгрия). В момент отбора проб и регистрации показателей применяли уретановую анестезию (Soldatov, 2005).

Гематологические исследования. Концентрацию гемоглобина (*Hb*) в крови определяли при помощи гемиглобинцианидного метода с применением стандартного набора реактивов (НПО «Биолар»). Количество эритроцитов (*Er*) в крови подсчитывали в камере Горяева (Стенко, 1975). Насыщение артериальной (S_aO_2) и венозной (S_vO_2) крови кислородом определяли путем спектрофотометрирования проб при 540, 560, 576 нм [Крикливый и др., 1979] с последующим расчетом концентрации оксигемоглобина. Зная величины S_aO_2 и S_vO_2 , рассчитывали концентрации кислорода в артериальной (C_aO_2) и венозной крови (C_vO_2) с учетом коэффициента Гюфнера (1.34):

$$C_aO_2 = 1.34 \cdot Hb \cdot S_aO_2,$$

$$C_vO_2 = 1.34 \cdot Hb \cdot S_vO_2.$$

Тканевой кровоток. Объемный кровоток (Q) в красных и белых мышцах измеряли по методу H_2 -клиренса с электрохимической генерацией водорода, адаптированного к применению на водных животных (Вязовой и др., 1982). В работе использовали платиновый микроэлектрод (диаметр 150 мкм, длина 3 мм). Регистрацию осуществляли при помощи усилителя постоянного тока ОР-925 ("Radelkis", Венгрия) и потенциометра КСП-4. В момент регистрации использовали специальный станок, исключая продольные движения туловища. На основании полученных величин рассчитывали средневзвешенный кровоток (Q):

$$Q = k_1 Q_r + k_2 Q_w,$$

где k_1 , k_2 — коэффициенты, отражающие процентное соотношение красных и белых мышц в теле рыб; Q_r , Q_w — объемный кровоток в красных и белых мышцах.

Массоперенос и утилизация кислорода в скелетных мышцах. Величины массопереноса кислорода артериальной (V_aO_2) и венозной кровью (V_vO_2) определяли по следующим уравнениям:

$$V_aO_2 = C_aO_2 \cdot Q,$$

$$V_vO_2 = C_vO_2 \cdot Q.$$

Это позволило рассчитать скорость утилизации кислорода скелетными мышцами по уравнению Фика:

$$V_mO_2 = C_{(a-v)}O_2 \cdot Q.$$

Эффективность утилизации кислорода мышечной тканью оценивали по гемодинамическому эквиваленту (HE). Он отражает объем крови, который необходимо прокачать через ткань для извлечения условного объема кислорода:

$$HE = \frac{Q}{V_mO_2}.$$

Статистическая обработка и графическое оформление полученных результатов проведены с применением стандартного пакета Grapher (версия 7). Результаты представлены в виде $\bar{x} \pm S\bar{x}$. Достоверность различий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. О нормальности распределения выборочных совокупностей судили по значениям критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гематологические исследования. Снижение температуры воды до 5°C и содержание особей кефали в данных условиях в течение 5-ти суток сопровождалось увеличением концентрации гемогло-

бина в циркулирующей крови на 11% ($p < 0.05$) (рис. 1А). Однако в последующем значения данного показателя понижались и 41-46 сутки наблюдений оказывались на 14% ($p < 0.001$) ниже контрольного уровня. Аналогичные изменения претерпевало и число эритроцитов в крови рыб (рис. 1В).

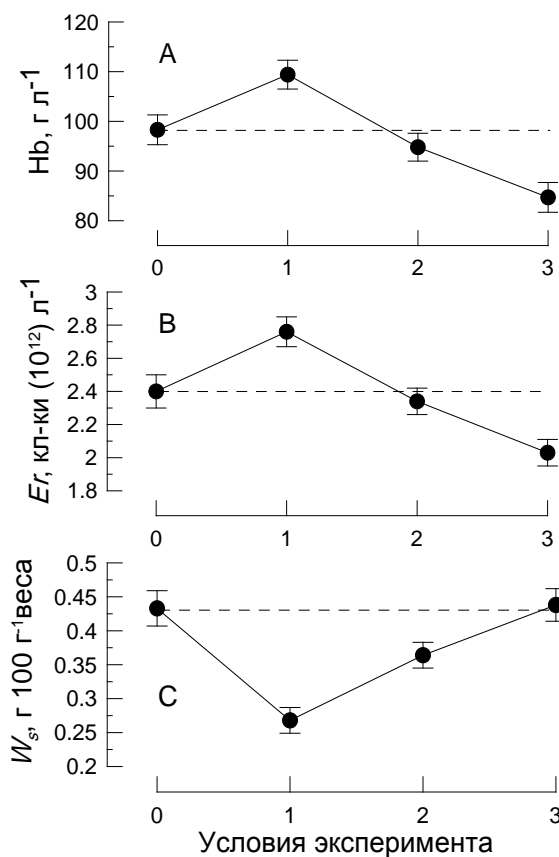


Рис. 1. Концентрация гемоглобина (А), число эритроцитов (В) в крови и вес селезенки (С) у кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии. 0 — контрольная группа, 15°C; 1 — эксперимент, 5°C, 1-5 суток; 2 — эксперимент, 5°C, 14-16 суток; 3 — эксперимент, 5°C, 41-46 суток.

Количественные показатели крови находились в обратной зависимости от веса селезенки (рис. 1С). В первые 5 суток наблюдений ее вес уменьшался на 38% ($p < 0.001$), а затем восстанавливался фактически до уровня контрольных значений. На рисунке 2 зависимость числа эритроцитов в крови от веса селезенки хорошо описывалась уравнением линейной регрессии при достаточно высоких значениях коэффициента детерминации (R^2) — 0.735.

К компенсационным процессам следует отнести и увеличение насыщения гемоглобина кислородом почти на 6% ($p < 0.001$) (табл. 1). Оно наблюдалось в первые 5 суток нахождения особей кефали при температуре 5°C и составило $91.0 \pm 0.3\%$. Затем насыщение кислородом несколько понижалось, но оставалось на 3-4% выше контрольных значений.

Рост концентрации гемоглобина в крови, отмеченный выше, и повышение степени его насыщения кислородом привели в течение 1-5 суток адаптации особей кефали к температуре 5°C к увеличению фактической концентрации кислорода в крови на 18-19% ($p < 0.01$) (табл. 1).

концентрации кислорода в крови на 18-19% ($p < 0.01$) (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация кислорода в крови и насыщение гемоглобина кислородом у кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии

Условия эксперимента	n	CO_2 (мл л ⁻¹)		SO_2 (%)	
		a	v	a	v
15°C (контроль)	8	112.6±5.1	84.5±0.2	85.3±1.3	63.3±2.2
5°C (опыт, 1-5 суток)	8	133.4±3.6	102.4±2.5	91.0±0.3	69.9±0.7
5°C (опыт, 14-16 суток)	8	113.4±3.5	88.4±2.7	89.3±0.4	69.6±0.7
5°C (опыт, 41-46 суток)	7	100.7±3.9	77.1±3.3	88.6±0.4	67.9±0.7

Примечание: CO_2 — концентрация кислорода в артериальной (a) и венозной (v) крови; SO_2 — насыщение кислородом артериальной и венозной крови; n — число особей

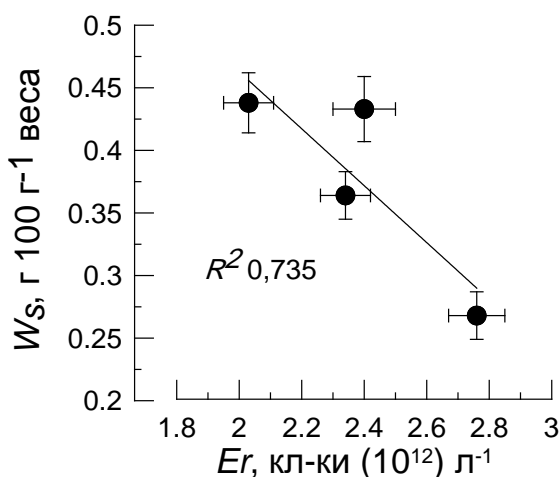


Рис. 2. Зависимость числа эритроцитов в крови кефали-сингиля от веса селезенки. 0 — контрольная группа, 15°C; 1 — эксперимент, 5°C, 1-5 суток; 2 — эксперимент, 5°C, 14-16 суток; 3 — эксперимент, 5°C, 41-46 суток.

Это должно было существенно повысить массоперенос кислорода к скелетным мышцам данного вида в условиях экспериментальной гипотермии. Однако данную реакцию можно отнести только к процессам, ответственным за срочную адаптацию организма. Уже на 14-16 суток эксперимента концентрация кислорода в крови кефалей возвращалась к контрольным значениям и в дальнейшем не претерпевала статистически значимых изменений.

Объемный тканевой кровоток. Величину тканевого кровотока оценивали в красных и белых мышцах кефалей. Результаты представлены на рисунке 3. Гипотермия вызывала снижение данного показателя в обоих типах тканей на начальных этапах адаптационного процесса (1–5 сутки эксперимента). Наиболее выраженные изменения отмечались в красных мышцах. Кровоток здесь понижался на 27% ($p < 0.001$). Величины, отмеченные на 1–5 сутки, сохранялись затем на протяжении всего периода наблюдений. Различия не были статистически выражены. Каких-либо компенсационных реакций не обнаружили. Сходные изменения происходили в белых мышцах. Ограничение кровотока составило 16%. Однако в виду значительной вариабельности полученных значений достоверных отличий выявлено не было.

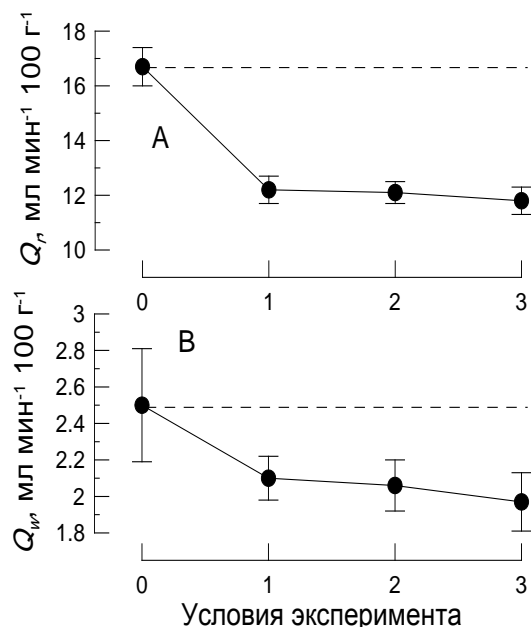


Рис. 3. Объемный кровоток в красных (А) и белых (В) мышцах кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии. 0 — контрольная группа, 15°C; 1 — эксперимент, 5°C, 1–5 суток; 2 — эксперимент, 5°C, 14–16 суток; 3 — эксперимент, 5°C, 41–46 суток.

На основании полученных значений Q_r и Q_w был рассчитан средневзвешенный кровоток с учетом доли красных и белых мышечных волокон в скелетных мышцах кефалей (см. материал и методы). На красные мышцы у данного вида приходилось $13.0 \pm 0.3\%$ мышечной массы, остальное на белые — $87.0 \pm 0.3\%$. Расчет средневзвешенного кровотока был необходим для определения величин массопереноса кислорода для скелетных мышц в целом.

Массоперенос и утилизация кислорода. В начале адаптационного процесса (1–5 сутки, 5°C) величина массопереноса кислорода артериальной и венозной кровью была близка к контрольным значениям (15°C) (рис. 4).

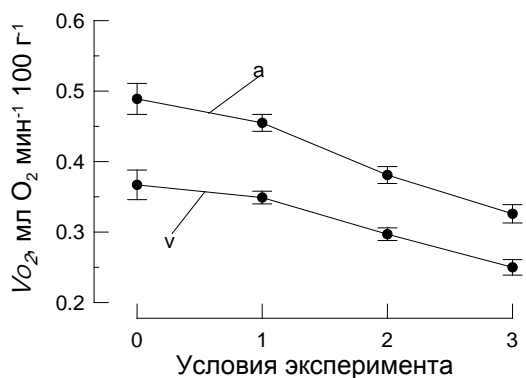


Рис. 4. Массоперенос кислорода артериальной (а) и венозной (v) кровью в скелетных мышцах кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии. 0 — контрольная группа, 15°C; 1 — эксперимент, 5°C, 1–5 суток; 2 — эксперимент, 5°C, 14–16 суток; 3 — эксперимент, 5°C, 41–46 суток.

Различия не были статистически значимы. Однако на 14–16 суток наблюдений поток кислорода через скелетные мышцы кефалей явно ограничивался. Минимальные величины были зарегистрированы на финальных этапах эксперимента (41–46 сутки). Артериальный и венозный массоперенос кислорода был на 32–33% ниже контрольного уровня ($p < 0.001$) и составлял соответственно 0.326 ± 0.013 и 0.250 ± 0.011 мл O₂ мин⁻¹ 100 г⁻¹ веса. Зная данные величины по уравнению Фика можно в целом оценить интенсивность потребления кислорода скелетными мышцами. При 15°C эта величина составляла 0.122 ± 0.007 мл O₂ мин⁻¹ 100 г⁻¹ веса. Снижение температуры воды до 5°C вначале не оказывало существенного влияния (1–5 сутки). V_{mO_2} было близко к контрольным значениям — 0.106 ± 0.005 мл O₂ мин⁻¹ 100 г⁻¹ веса. Однако затем оно существенно понижалось и на 41–46 сутки эксперимента составляло 0.076 ± 0.003 мл O₂ мин⁻¹ 100 г⁻¹ веса, что на 35% ($p < 0.001$) ниже.

Об эффективности потребления кислорода тканями можно судить по проценту его утилизации и гемодинамическому эквиваленту (HE). Эти величины представлены в таблице 2. Как видно процент утилизации кислорода скелетными мышцами у кефали-сингиля не зависел от температуры среды и составлял 22–26%. В то же время HE претерпевал определенные изменения. На 41–46 сутки экспери-

мента его значения были на 18% выше контрольных величин. Это означает, что для извлечения сходного количества кислорода мышцам при 5°C требуется больший объем крови.

Таблица 2. Показатели эффективности утилизации кислорода скелетными мышцами кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии

Условия эксперимента	n	Утилизация O ₂ , %	HE
15°C (контроль)	8	25,2±1,6	36,4±2,1
5°C (опыт, 1–5 суток)	8	23,2±0,6	32,7±1,5
5°C (опыт, 14–16 суток)	8	22,0±0,6	40,4±1,7
5°C (опыт, 41–46 суток)	7	23,4±0,7	43,0±1,6

Примечание: n — число особей; HE — гемодинамический эквивалент

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение температуры воды в диапазоне 5–15°C вызывало заметное угнетение окислительного метаболизма в скелетных мышцах кефали. Однако оно было ниже ожидаемого по правилу Вант-Гоффа. Значения Q₁₀, рассчитанные для данного температурного диапазона, не превышали 1,7, тогда как они должны находиться в пределах 2–3 (Ивлева, 1981). Это позволяет допустить наличие функциональной коррекции процессов энергетического метаболизма мышечной ткани при адаптации к условиям гипотермии. Особенно это было заметно на начальных этапах эксперимента (1–5 сутки). Интенсивность потребления кислорода скелетными мышцами кефалей при 5°C была близка к отмеченной при температуре 15°C. Различия не были статистически значимы. Анализ полученных результатов позволил выявить несколько реакций компенсационного порядка:

- увеличение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов в крови;
- повышение насыщения гемоглобина кислородом;
- поддержание сравнительно высокой скорости объемного кровотока в мышцах.

Данные реакции должны повышать кислородную емкость крови и поддерживать объем доставляемого к мышцам кислорода на относительно высоком уровне.

Увеличение числа эритроцитов в крови может быть обусловлено рядом процессов: выбросом эритроцитов в кровотоки и кровяных депо (селезенка), усилением продукционных процессов в кровеносной ткани (пронефрос), дегидратацией плазмы крови (Soldatov, 2005). Первые сведения о способности селезенки рыб резервировать старую эритроцитарную массу были получены на желтохвосте (*Seriola quinqueradiata*) (Yamamoto et al., 1980; 1983). Участие данного органа в коррекции кислородной емкости крови у рыб отмечено во многих работах (Wells, Weber, 1990; Pearson, Stevens, 1991; Houston et al., 1996). В нашем случае установлена обратная линейная зависимость между числом эритроцитов в крови и весом селезенки (R^2 0.735). Это позволяет рассматривать опорожнение кровяных депо как основной процесс, определяющих рост кислородной емкости крови кефалей при адаптации к гипотермии. Однако эффективность его сохранялась только на начальных этапах адаптации. На 14–16 сутки эксперимента число эритроцитов в крови оказывалась ниже контрольных значений и в дальнейшем неуклонно снижалось.

Участие эритропоэтических процессов в росте кислородной емкости крови маловероятно по двум причинам. Во-первых, этому не способствует низкая температура. Во-вторых, если допустить, что эритроцитарное равновесие и смещается в пользу продукционных процессов, то оно не может обеспечить эффективный рост числа эритроцитов в крови в относительно короткий промежуток времени — 1–5 суток. Случаи же дегидратации плазмы крови у рыб в условиях гипотермии не известны. Поэтому участие этого процесса в коррекции кислородной емкости крови пока можно оставить под знаком вопроса.

Увеличение насыщения крови кефалей кислородом в условиях гипотермии скорее является пассивным, а не активным процессом. В виду экзотермичности реакции оксигенации гемоглобина понижение температуры должно облегчать образование его комплекса с кислородом. Этот процесс затрагивал артериальную и венозную кровь. Изменения развивались уже в первые сутки и сохранялись на протяжении всего периода наблюдений. Это доказывает, что они скорее были индуцированы внешними, а не внутренними причинами.

К компенсационным процессам следует отнести и поддержание сравнительно высокой скорости объемного кровотока в скелетных мышцах кефали в условиях гипотермии. В сравнении с контрольной группой рыб изменения были незначительны: в красных мышцах они немного превышали

25%, а в белых были менее 20 %, при этом в последнем случае результаты не были достоверны. К аналогичному заключению можно прийти и на основе сопоставления значений Q_{10} . Так, если энергетический обмен в скелетных мышцах кефали при понижении температуры в диапазоне 5–15°C угнетался в 1.6 раза, то объемный кровоток — только в 1.2–1.4 раза. Следует обратить внимание и на эффективность утилизации кислорода. При 15 и 5°C она была близкой. Процент утилизации кислорода фактически совпал, а увеличение *HE* было незначительно и статистически недостоверно.

Из представленных в настоящей статье результатов следует, что организм оксифильной, теплолюбивой кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии «пытается» поддерживать относительно высокий уровень окислительного метаболизма в скелетных мышцах. Об этом свидетельствуют сравнительно низкие значения коэффициента Q_{10} и ряд компенсационных реакций, развивающихся на уровне сосудов микроциркуляторного русла и циркулирующей крови.

Кефаль-сингиль — это пелагический стайный вид, отличающийся высокой миграционной активностью (Шекк, 2012). В азово-черноморском регионе для сингиля характерны сезонные миграции из северных в южные акватории Черного моря. Основным индуктором такого поведения является снижение температуры воды (Шекк, 2012). Поддержание высокой скорости окислительного метаболизма в скелетных мышцах — основа миграционного состояния у данного вида. Это, по-видимому, и определяет особенности кислородного режима мышечной ткани кефали-сингиля в условиях внешней гипотермии.

Таким образом, снижение температуры воды в диапазоне 5–15°C вызывало угнетение процессов энергетического обмена в скелетных мышцах кефали-сингиля в 1.6 раза, что не соответствовало правилу Вант-Гоффа. Это было обусловлено развитием ряда компенсационных процессов, направленных на сохранение высокой скорости окислительного метаболизма в мышечной ткани. В ней поддерживалась сравнительно высокая скорость объемного кровотока при сопоставимой с 15°C эффективностью утилизации кислорода. Одновременно повышалась кислородная емкость крови, что было связано с опорожнением кровяных депо (селезенка) и увеличением процента насыщения гемоглобина кислородом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арсан О.М. Роль температуры водной среды в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в организме рыб // Гидробиол. ж. 1986. Т. 22. С. 57–62. Arsan O.M. Rol' temperatury vodnoi sredy v regulyatsii protsesov glikoliza i trikarbonovogo tsikla v organizme ryb // Hidrobiologicheskii Zhurnal. 1986. T. 22. S. 57–62. [Arsan O. M. The role of the temperature of the aquatic environment in the regulation of glycolysis and tricarboxylic cycle in fish // Hydrobiol. J. 1986. Vol. 22. P. 57–62.] In Russian.
- Арсан О.М. Участие Ca^{2+} в регуляции процессов гликолиза и трикарбонового цикла в тканях карпа при различном температурном режиме водной среды // Гидробиол. ж. 1986. Т. 22. С. 71–74. Arsan O.M. Uchastie Ca^{2+} v regulyatsii protsesov glikoliza i trikarbonovogo tsikla v tkanyakh karpa pri razlichnom temperaturnom rezhime vodnoi sredy // Hidrobiologicheskii Zhurnal. 1986. T. 22. S. 71–74. [Arsan O. M. The involvement of Ca^{2+} in the regulation of glycolysis and tricarboxylic cycle in the tissues of common carp at different temperatures of the aquatic environment // Hydrobiol. J. 1986. Vol. 22. P. 71–74.] In Russian.
- Вязовой В.В., Матюхин В.А., Нешумова Т.В., Шошенко К.А. Кровоток в красных и белых скелетных мышцах байкальского черного хариуса *Thymallus arcticus baicalensis* (D.) при плавании с разными скоростями // Вопр. ихтиол. 1982. Т. 22. № 5. С. 857–863. Vyazovoi V.V., Matyukhin V.A. Neshumova T.V., Shoshenko K.A. Krovotok v krasnykh i belykh skeletnykh myshtsakh baikal'skogo chernogo khariusa *Thymallus arcticus baicalensis* (D.) pri plavanii s raznymi skorostyami // Voprosy Ikhtiologii. 1982. T. 22, No. 5. S. 857–863. [Vyazovoi V.V., Matyukhin V.A., Neshumova T.V., Shoshenko K.A. Blood flow in red and white skeletal muscles of the Baikal black grayling *Thymallus arcticus baicalensis* (D.) under swimming at different speeds // J. Ichthyology. 1982. Vol. 22. No. 5. P. 857–863.] In Russian.
- Гулевский А.К., Релина Л.И., Жегунова Е.Г. и др. Роль гликолиза при холодовой адаптации карася серебряного *Carassius auratus gibelio* // Пробл. криобиологии. 2007. Т. 17. С. 64–70. Gulevskii A.K., Relina L.I., Zhegunova E.G. Rol' glikoliza pri holodovoi adaptatsii karasya serebryanogo *Carassius auratus gibelio* // Problemy kriobiologii. 2007. T. 17. S. 64–70. [Gulevsky A.K., Relina L.I., Zhegunova E.G., etc., The role of glycolysis in cold adaptation of silver crucian carp *Carassius auratus gibelio* // Problems of Cryobiology. 2007. Vol. 17. P. 64–70.] In Russian.
- Ивлева И.В. Температура среды и скорость энергетического обмена у водных животных. Киев: Наукова думка, 1981. 232 с. Ivleva I.V. Temperatura sredy i skorost' energeticheskogo obmena u vodnykh zhyvotnykh. Kiev: Naukova dumka, 1981. 232 s. [Ivleva, I. V. Ambient temperature and the rate of energy metabolism in aquatic animals. Kiev: Scientific Thought, 1981. 232 p.] In Russian.
- Крикливый И.А., Рекун Г.М., Артук В.П., Стародуб Н.Ф. Методы изучения функциональных свойств гемоглобина / Методы молекулярной биологии. Киев: Наукова думка, 1979. С. 191–201. Kriklyviy I.A., Rekun G.M., Artukh V.P., Starodub N.F. Metody izucheniya funktsional'nykh svoystv gemoglobina // Metody molekulyarnoi biologii. Kiev: Naukova dumka, 1979. S. 191–201. [Kriklyviy I.A., Rekun G.M., Artukh V.P., Starodub N.F. Methods

- of studying the functional properties of hemoglobin / Molecular biology techniques. Kiev: Scientific Thought, 1979. P. 191–201.] In Russian.
- Куликова Н.И., Шекк П.В., Руденко В.И. Об отношении молоди черноморских кефалей к низкой температуре // Вопросы ихтиологии. 1986. Т. 26. С. 119–128. Kulikova N.I., Shekk P.V., Rudenko V.I. Ob otnoshenii molodi chernomorskikh kefalei k nizkoi temperature // Voprosy Ikhtiologii. 1986. T. 26. S. 119–128. [Kulikova N.I. Shekk P.V., Rudenko V.I. On the relation of juvenile Black sea mullets to low temperature // J. Ichthyology. 1986. Vol. 26. P. 119–128.] In Russian.
- Солдатов А.А. Влияние экспериментальной гипотермии на состояние капиллярной сети скелетных мышц морских рыб // Совр. пробл. физиол. биохим. водных организмов. Сб. научных статей. Т. 1. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2010. С. 278–282. Soldatov A.A. Vliyaniye eksperimentalnoi gipotermii na sostoyanie kapillyarnoi seti skeletnykh myshts morskikh ryb // Sovremennii problem fiziologii i biokhimii vodnykh organizmov. Sbornik nauchnikh statei. T. 1. Petrozavodsk: KarNTS RAN, 2010. S. 278–282. [Soldatov A. A. Influence of hypothermia on experimental condition of the capillary network in skeletal muscles of marine fish // Modern. Probl. Physiol. and Biochem. Aquatic Organisms. Proceed. Sci. Reports. Vol. 1. Petrozavodsk: KRC RAS, 2010. P. 278–282.] In Russian.
- Солдатов А.А., Парфенова И.А. Напряжение кислорода в крови, скелетных мышцах и особенности тканевого метаболизма кефали-сингиля в условиях экспериментальной гипотермии // Проблемы криобиологии. 2009. Т. 19. С. 290–300. Soldatov A.A., Parfyonova I.A. Napryazhenie kisloroda v krovi, skeletnykh myshtsakh i osobennosti tkanevogo metabolizma kefali-singilya v usloviyakh eksperimental'noi gipotermii // Problemi kriobiologii. 2009. T. 19. S. 290–300. [Soldatov A. A., Parfyonova I. A. Oxygen tension in the blood, skeletal muscle and tissue, and features of mullet metabolism in experimental hypothermia conditions // Problems of Cryobiology. 2009. Vol. 19. P. 290–300.] In Russian.
- Стенко М.И. Кровь / Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. С. 5–135. Stenko M.I. Krov' / Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya. M.: Meditsina, 1975. S. 5–135. [Stenko M.I. Blood / Handbook of clinical laboratory methods. M.: Medicine, 1975. P. 5–135.] In Russian.
- Шекк П.В. Биолого-технологические основы культивирования кефалевых и камбаловых. Херсон: ЧП Гринь, 2012. 306 с. Shekk P.V. Biologo-tehnologicheskie osnovy kul'tivirovaniya kefalevykh i kambalovykh. Kherson: СНР Grin', 2012. 306 s. [Shekk P.V. Biotechnological basis of the cultivation of mullet and flatfish. Kherson: PE Grin', 2012. 306 p.] In Russian.
- Шекк П.В., Куликова Н.И., Руденко В.И. Возрастные изменения реакции черноморского сингиля *Liza aurata* на низкую температуру // Вопросы ихтиологии. 1990. Т. 30. С. 94–106. Shekk P.V. Kulikova N.I., Rudenko V.I. Vozrastnie izmeneniya reaktsii chernomorskogo singilya *Liza aurata* na nizkuyu temperaturu // Voprosi ikhtiologii. 1990. T. 30. S. 94–106. [The Shekk P.V., Kulikova N.I., Rudenko V.I. Age-related changes in the response of the black sea mullet *Liza aurata* to low temperature // J. Ichthyology. 1990. Vol. 30. P. 94–106.] In Russian.
- Bosworth C.A., Chou C.W., Cole R.B., Rees B.B. Protein expression patterns in zebrafish skeletal muscle: initial characterization and the effects of hypoxic exposure // Proteomics. 2005. Vol. 5. P. 1362–1371.
- Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M. et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*) // Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol. 2006. Vol. 143. P. 494–503.
- Houston A.H. Blood and circulation // Methods for fish biology. N.Y.: Amer. Fish. Society, 1990. P. 273–334.
- Houston A.H., Roberts W.C., Kennington J.A. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish // Fish Physiol. Biochem. 1996. Vol. 15. No. 6. P. 481–489.
- Ju Z., Wells M.C., Heater S.J., Walter R.B. Multiple tissue gene expression analyses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to hypoxia // Comp. Biochem. Physiol. 2007. Vol. 145C. P. 134–144.
- Pearson M.P., Stevens E.D. Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Fish Physiol. Biochem. 1991. Vol. 9. No. 1. P. 39–50.
- Soitamo A.J., Raabergh C.M.I., Gassmann M. et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1) from rainbow trout: Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 19699–19705.
- Soldatov A.A. Physiological aspects of effects of urethane anesthesia on the organism of marine fishes // Hydrobiol. J. (Begell House). 2005. Vol. 41. No. 1. P. 113–126.
- Soldatov A.A. Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system (review) // J. Evolutionary Biochem. Physiol. (Springer). 2005. Vol. 41, No. 3. P. 272–281.
- Wells R.W.G., Weber R.E. The spleen in hypoxic and exercised rainbow trout // J. Exp. Biol. 1990. Vol. 150. P. 461–466.
- Yamamoto K., Itazawa Y., Kobayashi H. Supply of erythrocytes into the circulating blood from the spleen of exercised fish // Comp. Biochem. Physiol. 1980. Vol. 65A. No. 1. P. 5–11.
- Yamamoto K., Itazawa Y., Kobayashi H. Erythrocyte supply from the spleen and hemoconcentration in hypoxic yellowtail // Mar. Biol. 1983. Vol. 73. No. 3. P. 221–226.

THE OXYGEN REGIME OF THE SKELETAL MUSCLES OF THE MULLET (*LIZA AURATA* RISSO) AT EXPERIMENTAL HYPOTHERMIA

A. A. Soldatov^{1,2}, I. A. Parfenova²

¹ A. O. Kovalevskii Institute of Marine Biological Researches, Russian Academy of Sciences
292011 Sevastopol, Nakhimov Ave., 2, e-mail: alekssoldatov@yandex.ru

² Sevastopol State University,
299053 Sevastopol, Universitetskaya St. 33

The adaptation process of mullets (*Liza aurata* Risso) to a temperature of 5°C during 46 days was investigated. Control group fish was kept at 15±1°C. The water temperature in aquaria was lowered at a speed of 0.2°C h⁻¹ from 15 to 5°C. During the first 5 days adaptation to 5°C in the mullet organism noted the development of a number of compensatory reactions: the increase in the number of circulating red blood cells and improving the blood oxygen saturation that substantially increased the concentration of oxygen in the blood. The first was associated with the emptying of the blood depot (spleen), the second relief of blood oxygen saturation in mind exothermicity of oxygenation reaction of hemoglobin. The values of the oxygen mass transfer in arterial and venous blood in skeletal muscle were decreased uniformly throughout the observation period that was determined by the limit of tissue blood flow. The intensity of oxygen consumption by the muscle was decreased by 38 % (p<0.001) and on 41–46 days of observations amounted to 0.076±0,003 ml O₂ min⁻¹ 100 g⁻¹ weight. The causes underlying the identified changes are discusses.

Key words: hypothermia, skeletal muscle, oxygen mass transfer and utilization, hemoglobin, erythrocytes, tissue blood flow, marine fish.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА У ПРЭСНОВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К ФАКТОРАМ СРЕДЫ

В. И. Мартемьянов

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru

Приведен обзор по физиологическим механизмам регуляции водного гомеостаза у пресноводных гидробионтов при адаптации к различным факторам среды. Показано, что активность физиологических функций, связанных с работой почек, зависит от условий среды. Их функционирование направлено на обеспечение стабильности водного гомеостаза во всем интервале того или иного фактора, который вид может перенести. Стрессоры вначале повреждают водный гомеостаз на определенное время, а затем за счет усиления защитных функций организма происходит восстановление и стабилизация параметра на исходном или новом уровне. Осуществлен критический анализ понятия о гомеостазе, которое используется в физиологии. На основе обсуждения данных дается более понятное определение гомеостаза.

Ключевые слова: пресноводные гидробионты, адаптация, регуляция, внутренняя среда, физиологические функции, водный гомеостаз.

ВВЕДЕНИЕ

Обмен многих веществ между гидробионтами и средой осуществляется через жабры. Они имеют обширную поверхность, пронизанную многочисленными капиллярами, отделенными от внешней среды одним слоем высокопроницаемых эпителиальных клеток. Такая структура жабр позволяет растворенному в воде кислороду легко проникать в кровь. С другой стороны, протекающая через капиллярную систему жабр кровь (или гемолимфа), испытывает повреждающее действие на показатели водно-солевого гомеостаза осмотических и диффузионных сил из-за различий содержания ионов во внутренней и внешней среде. Для понимания механизмов адаптации необходимы знания о способности физиолого-биохимических систем организма противостоять повреждающим процессам, оказываемых на гомеостаз факторами среды.

Общая концентрация осмотических веществ в плазме крови пресноводных организмов существенно выше, чем в наружной среде (табл. 1). Вследствие этого между внутренней и наружной средой создается осмотический градиент, способствующий диффузии воды внутрь организма. Проницаемость покровов тела пресноводных животных к воде является незначительной.

Таблица 1. Осмотический градиент между организмом рыб и пресной водой

Вид	Осмотическая концентрация		Осмотический градиент между организмом и средой, мосм/л ($C_1 - C_2$)	Ссылка
	Плазма (сыворотка) крови, мосм/л (C_1)	Пресная вода, мосм/л (C_2)		
Карп <i>Cyprinus carpio</i>	268.7	11.6	257.1	Hegab, Hanke, 1982
Веслонос <i>Polyodon spathula</i>	221.6±2.5	3	218.6	Краюшкина и др., 1996
Радужная форель <i>Salmo gairdneri</i>	228±14	12	216	Rao, 1969
Лещ <i>Abramis brama</i>	241.1±2.2	5.4	235.7	Мартемьянов, 2014a
Плотва <i>Rutilus rutilus</i>	270.0±8.5	5.4	264.6	– " –
Язь <i>Leuciscus idus</i>	260.5±4.1	5.4	255.1	– " –
Густера <i>Blicca bjoerkna</i>	247.7	5.4	242.3	– " –
Уклея <i>Alburnus alburnus</i>	244.3±8.2	5.4	238.9	– " –
Щука <i>Esox lucius</i>	290.4±20.3	5.4	285	– " –
Судак <i>Sander lucioperca</i>	268.8	5.4	263.4	– " –
Окунь <i>Perca fluviatilis</i>	279.2±6.3	5.4	273.8	– " –

Проникновение воды происходит главным образом через жаберный эпителий в кровь. Небольшая часть воды поступает в организм пресноводных рыб за счет заглатывания воды (Lahlou et al., 1969; Motais et al., 1969; Isaia, 1972). Ток воды (осмос) пропорционален разности общих концентраций растворенных веществ во внутренней (C_1) и внешней (C_2) среде (Prosser, 1973):

$$J_{осм} = AL (C_1 - C_2) RT,$$

где A — поверхность ($см^2$) через которую происходит диффузия воды, L — коэффициент осмотической проницаемости, R — газовая постоянная, T — температура.

Мерой, поступающей в организм пресноводных рыб воды, служит количество мочи, продуцируемой почками. Показано, что у рыб находящихся в пресной воде, почки с определенной скоростью продуцируют гипотоничную мочу (табл. 2), выводя излишки воды, проникающей за счет осмоса и питья.

Таблица 2. Скорость продуцирования мочи почками рыб и круглоротых, содержащихся в пресной воде

Вид	Скорость продуцирования мочи, мл/кг час	Ссылка
Карп <i>Cyprinus carpio carpio</i>	0.7–10.8	Пора, Прекуп, 1960
– " –	0.14–1.31	Лаврова, Наточин, 1977
Лещ <i>Abramis brama</i>	0.4±0.1	– " –
Жерех <i>Aspius aspius</i>	0.67±0.24	– " –
Радужная форель <i>Salmo gairdneri</i>	4.2±0.33	Fromm, 1963
– " –	3.31±0.67	Bradbury et al., 1987
Карась <i>Carassius auratus</i>	11.2±1.22	Lahlou et al., 1969
– " –	14.4±1.3	Motais et al., 1969
– " –	2.97–19.25	Isaia, 1972
– " –	0.43–4.48	Mackay, 1974
Панцирная щука <i>Lepisosteus oculatus</i>	8.3–16.7	Prosser, 1973
Угорь <i>Anguilla anguilla</i>	3.5±0.41	Sharratt et al., 1964
– " –	0.77–7.4	Motais, Isaia, 1972
Камбала <i>Platichthys flesus</i>	2.9±0.3	Motais et al., 1969
Канальный сомик <i>Ictalurus punctatus</i>	8.1±0.72	Norton, Davis, 1977
Чукучан <i>Catostomus commersonii</i>	1.2–4.4	Mackay, Beatty, 1968
Скат-хвосток <i>Dasyatis sabina</i>	10±1	Janech, Piermarini, 2002
Речная минога <i>Lampetra fluviatilis</i>	10.2±1.3	Bentley, Follett, 1963

Основная доля осмотической концентрации внутренней среды гидробионтов обуславливается уровнем хлористого натрия. У пресноводных гидробионтов выявлена четкая связь между осмотической концентрацией, содержанием ионов натрия во внутренней среде и регуляцией водного гомеостаза во всем интервале какого-либо фактора среды, который могут перенести особи того или иного вида.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА У ПРЭСНОВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К СОЛЕННОСТИ

У пресноводных рыб в диапазоне солёности 0.09–6 г/л содержание натрия в плазме крови поддерживается у карпа (рис. 1а) и бычка-цуцика (рис. 1б) на определенном постоянном уровне. Увеличение солёности выше 6 г/л, сопровождается возрастанием содержания натрия в плазме крови рыб. Такая реакция гидробионтов на рост концентрации натрия в воде связана с особенностями водного обмена. Повышение солёности воды вызывает снижение разности концентрации ионов натрия между плазмой крови рыб и средой (рис. 1 в, г). В соответствующей пропорции падает осмотический градиент. Это ведет к уменьшению тока воды из внешней среды через жаберный эпителий в кровь. При падении осмотического градиента между организмом рыб и средой до минимального уровня, скорость диуреза многократно снижается, в среднем в 4.2–5.4 раза, не достигая нулевых значений (Bentley, Follett, 1963; Lahlou et al., 1969; Norton, Davis, 1977; Furspan et al., 1984). Поддержание минимального осмотического градиента в зоне повышенной солёности свидетельствует, что организм нуждается в поступлении определенного количества воды для формирования мочи, с которой выводятся продукты обмена. Чтобы обеспечить необходимый осмотический градиент для притока воды в организм, карп и бычок-цуцик начинают увеличивать концентрацию натрия во внутренней среде при повышении солёности выше 6 г/л.

Содержание воды в организме рыб поддерживается на относительно постоянном уровне у карпа в диапазоне солёности до 8 г/л (рис. 1д), бычка-цуцика до 12 г/л NaCl (рис. 1е). Разность концентрации натрия между плазмой крови рыб и внешней средой составляет 12 ммоль/л у карпа при солёности 8 г/л и 23 ммоль/л у бычка-цуцика при 12 г/л NaCl. Показано, что минимальный осмотический градиент концентрации натрия необходимый для поддержания уровня воды у дрейссены *Dreissena polymorpha*

составляет 6 ммоль/л при солёности среды 1.3 г/л NaCl (Martemyanov, 2011). Повышение солёности выше критических значений сопровождалось обезвоживанием организма (рис. 1 *д, е*). Это указывает на то, что осмотический градиент концентрации натрия для дрейссены ниже 6 ммоль/л, карпа ниже 12 ммоль/л, а бычка-цуцика ниже 23 ммоль/л являются недостаточными для притока необходимого количества воды в организм, требуемой на формирование мочи. В результате на эти нужды расходуется вода организма, приводя к его обезвоживанию. При этом, чем выше солёность, тем меньше осмотический градиент, сопровождающийся увеличением степени обезвоживания организма.

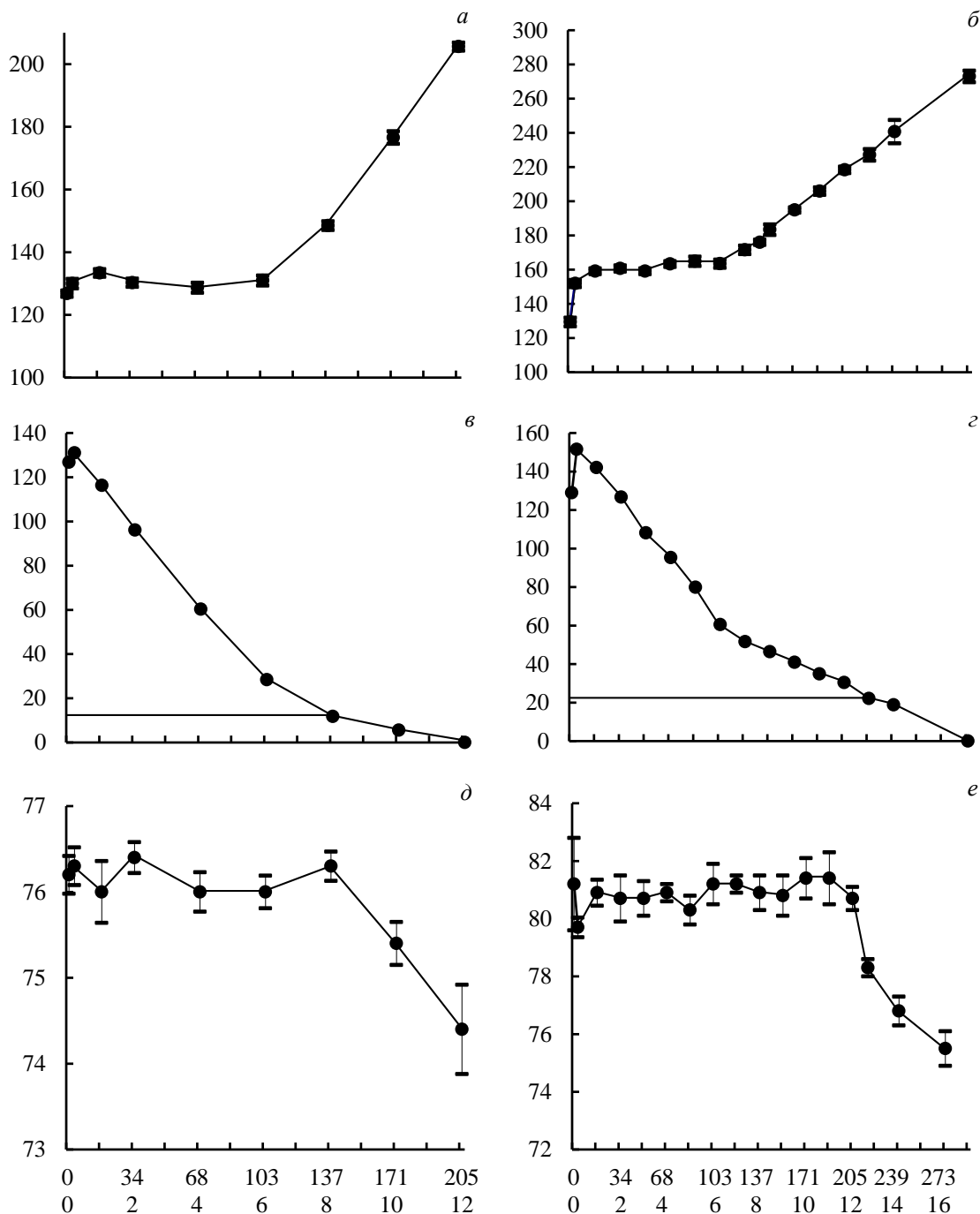


Рис. 1. Показатели водно-солевого обмена карпа и бычка-цуцика в зависимости от солёности среды (Мартемьянов, 2013а): *а* — содержание натрия (ммоль/л) в плазме крови карпа, *б* — содержание натрия (ммоль/л) в плазме крови бычка-цуцика, *в* — разность концентрации натрия между плазмой крови карпа и средой, *з* — разность концентрации натрия между плазмой крови бычка-цуцика и средой, *д* — содержание воды (%) в организме карпа, *е* — содержание воды (%) в организме бычка-цуцика. По оси абсцисс — солёность среды, ммоль/л Na (1 строка), г/л NaCl (2 строка).

При максимальной солености 2,5, 12, 16 г/л NaCl, соответственно, у дрейссены, карпа, бычка-цуцика достигалось состояние близкое к изонатремии (равенства уровня натрия в плазме и среде). При равенстве концентраций ионов в плазме крови и воде, осмотический градиент между организмом и средой отсутствует. В этом случае дополнительного поступления воды в организм, необходимого для формирования мочи, не происходит. Такая ситуация является несовместимой с жизнедеятельностью организма. Следовательно, такие уровни солености являются предельными для данных видов гидробионтов и несовместимыми для их длительного пребывания в этой среде.

Показатель оводненности организма пресноводных рыб служит надежным критерием для оценки толерантных и критических диапазонов солености среды. В пределах толерантного диапазона солености содержание воды в организме гидробионтов поддерживается на стабильном уровне, свидетельствуя о нормальном функционировании осмотической регуляции. В критической зоне солености наблюдается обезвоживание организма, указывающее на проблемы, связанные с осмотической регуляцией. Полученные результаты (рис. 1) показывают, что толерантный диапазон солености простирается до 8 и 12 г/л NaCl, соответственно, для карпа и бычка-цуцика. Критическая зона солености, соответственно для карпа и бычка-цуцика, находится в пределах 8–12 г/л и 12–16 г/л NaCl.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА У ПРЭСНОВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ АДАПТАЦИИ К ТЕМПЕРАТУРЕ

Повышение температуры воды сопровождается увеличением скорости диуреза у пресноводных рыб (рис. 2), свидетельствуя об усилении тока воды по осмотическому градиенту через жабры в кровь. Как было показано выше, поступление воды в организм пресноводных гидробионтов зависит от величины осмотического градиента. Осмотическая концентрация плазмы крови в зависимости от температуры акклимации представлена для ряда видов рыб, находящихся в пресной воде (табл. 3).

Таблица 3. Осмотическая концентрация плазмы (сыворотки) крови некоторых видов рыб при различных температурах акклимации

Вид	Температура, °С	Осмолярность, мосм/л	Ссылка
Карась <i>Carassius auratus</i>	1	270±3	Catlett, Millich, 1976
	5	276±4	
	10	288±2	
	21.5	295±2	
-- " --	0.5	341±6	Umminger, 1971a
	10	299±6	
	20	309±4	
Сомик-кошка <i>Ictalurus nebulosus</i>	0.5	282±7	Umminger, 1971b
	0.5	186±9	
	0.5	201±7	
	10	279±1	
	20	286±5	
Фундулюс <i>Fundulus heteroclitus</i>	0.1	316±19	Umminger, 1970
	4	299±14	
	11	372±7	
Радужная форель <i>Salmo gairdneri</i>	5	258±13	Rao, 1969
	15	228±14	

Полученные результаты неоднозначны. Так, при повышении температуры акклимации, у карася в одном случае наблюдалось небольшое увеличение осмотической концентрации плазмы крови (Catlett, Millich, 1976), а в другом нет (Umminger, 1971a). В трех вариантах опытов у сомика-кошки акклимированного к температуре 0,5°С осмотическая концентрация сыворотки крови существенно различалась (Umminger, 1971b). У радужной форели, акклимированной в зоне температур 5–15°С, осмотическая концентрация внутренней среды имела тенденцию к снижению (Rao, 1969).

В целом можно сказать, что изменения осмотической концентрации внутренней среды пресноводных рыб при повышении температуры акклимации проявляются в меньшей степени по сравнению со скоростью диуреза, который может усиливаться в 3,5-15,4 раз (рис. 2). Это указывает на то, что усиление тока воды в организм пресноводных гидробионтов при повышении температуры акклимации опосредуется в большей степени другими причинами, а не осмотическим градиентом.

Предполагается, что повышение температуры акклимации вызывает увеличение проницаемости покровов тела и жабр гидробионтов, способствуя возрастанию скорости проникновения воды в организм (Wikgren, 1953). Другие исследователи (Maskay, Beatty, 1968) полагают, что усиление про-

никновения воды в организм при повышении температуры акклимации может обуславливаться увеличением скорости тока крови и эффективной зоны дыхательной поверхности жабр.

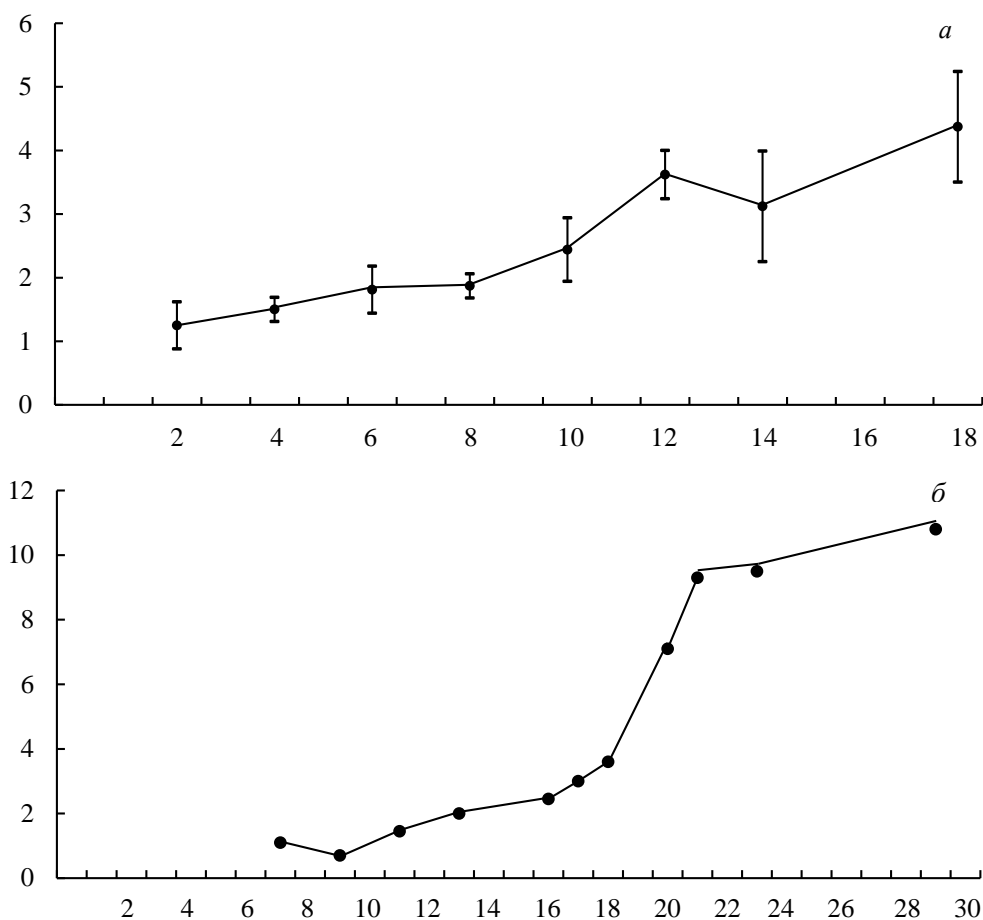


Рис. 2. Продукция мочи у белого чукучана (*а*, Mackay, Beatty, 1968) и карпа (*б*, Пора, Прекуп, 1960) в зависимости от температуры акклимации. По оси абсцисс: температура, °С; ординат — скорость продуцирования мочи, мл/кг час.

Каков бы не был механизм увеличения скорости поступления воды в пресноводные гидробионты при повышении температуры акклимации, почки за счет усиления диуреза эффективно выводят из организма избыток воды (рис. 2). В результате содержание воды в организме поддерживается на стабильных уровнях в ходе годового цикла (рис. 3) и во всем интервале температур, который особи того или иного вида могут выдержать (рис. 4). При этом у плотвы в природных условиях в ходе годового цикла, а у карпа в экспериментальных условиях, проявляется два уровня содержания воды в организме, отражающих разное физиологическое состояние рыб. У плотвы в нагульный период, а у карпа при повышенных температурах, содержание воды в организме поддерживается на пониженном уровне, обуславливая физиологическое состояние, связанное с ростом рыб. В условиях неблагоприятных для роста содержание воды в организме рыб поддерживается на повышенном уровне.

Таким образом, приведенные данные показывают, что количество воды, поступающей в организм пресноводных гидробионтов, зависит от факторов среды. При этом повышение солености среды сопровождается существенным уменьшением водной нагрузки на организм, тогда как увеличение температуры акклимации вызывает усиление скорости проникновения воды в тело пресноводных гидробионтов. Почки пресноводных гидробионтов эффективно выводят излишки воды из организма, поддерживая водный гомеостаз на стабильных уровнях в толерантных диапазонах факторов среды.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА У ПРЭСНОВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ СТРЕССЕ

Ряд данных свидетельствует о том, что стрессорные воздействия нарушают водный гомеостаз, вызывая повышение массы тела пресноводных рыб (Westfall, 1943; Stevens, 1972; Kirk, 1974). Полагают, что это обусловлено за счет увеличения оводненности организма. В этих исследованиях изменение массы тела осуществлялось до воздействия и затем один раз через тот или иной промежуток времени. По таким косвенным фрагментарным данным невозможно определить, как и в какой сте-

пени изменяется уровень воды в организме рыб во времени от начала стрессорных воздействий и до завершения процесса акклимации к новым условиям.

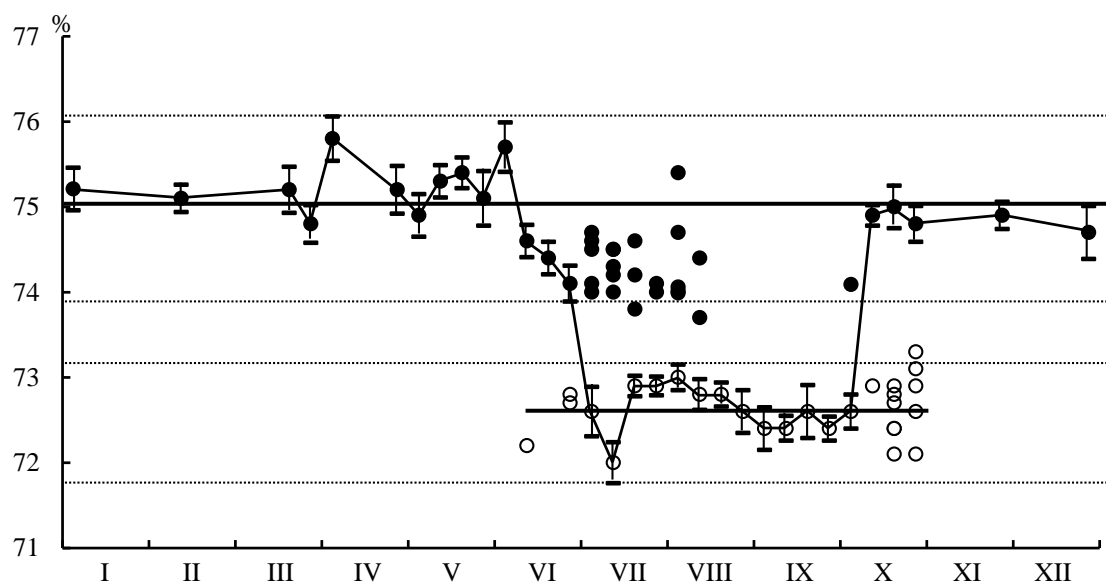


Рис. 3. Динамика содержания воды в организме производителей плотвы в ходе годового цикла (Martemyanov, 2013a). По оси ординат — содержание воды в организме; по оси абсцисс — месяцы года.

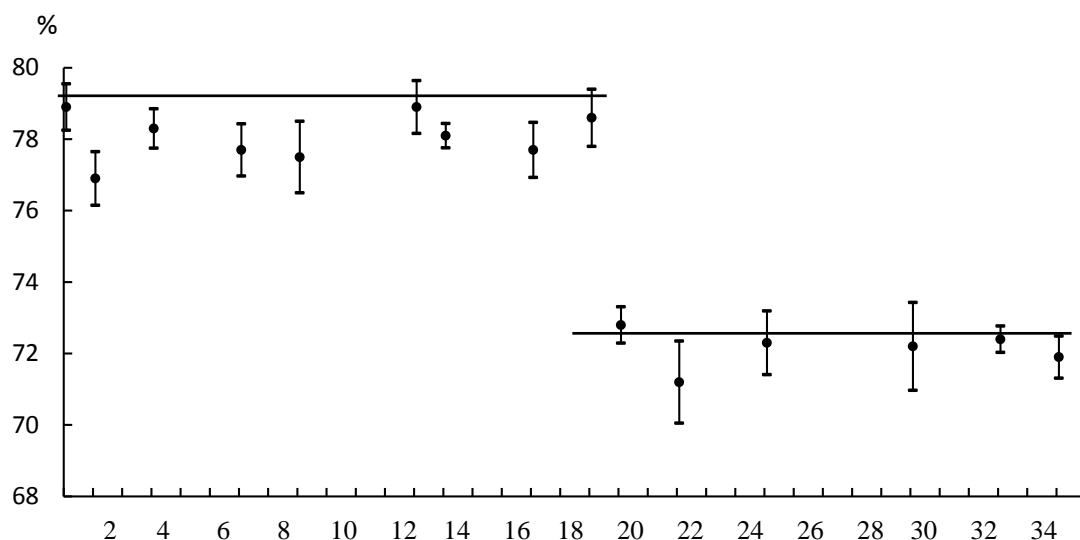


Рис. 4. Содержание воды в организме карпов в зависимости от температуры акклимации (Martemyanov, 2013b). По оси ординат — содержание воды в организме; по оси абсцисс — температура, °С.

Нами была изучена динамика содержания общей воды в организме окуня *Perca fluviatilis* L. от начала стрессорного воздействия, вызванного отловом и транспортировкой, и до завершения процесса акклимации к новым условиям (рис. 5). Исходная концентрация воды в организме окуней составила $73.4 \pm 0.17\%$. В ответ на отлов и транспортировку рыб, содержание воды в организме окуней в начале резко, а затем постепенно, повышалось в течение 7 ч до $76.8 \pm 0.31\%$. Достоверно повышенный по отношению к исходному значению максимальный уровень воды сохранялся у рыб в пределах 1 сут после отлова. Этот факт свидетельствует, что в начальный период стресса происходит накопление воды в организме окуня.

Считается (Mazeaud et al., 1977; Wendelaar Bonga, 1997), что повышение содержания воды в организме пресноводных рыб в начальный период стресса обусловлено влиянием катехоламинов. Концентрация этих гормонов в крови различных видов животных резко увеличивается при стрессе. Предполагается (Mazeaud et al., 1977; Wendelaar Bonga, 1997), что эти гормоны, наряду с защитными функциями, побочно вызывают нарушение водного обмена за счет повышения проницаемости жабберного эпителия к воде. В результате этого в начальный период стресса происходит усиление скорости диффузии воды в тело пресноводных рыб, способствуя обводнению крови. Если это так, то со-

держание воды в плазме крови рыб должно увеличиваться. Проведенные нами исследования показали, что в начальный период стресса в течение 1 сут уровень воды в плазме крови леща и плотвы остается стабильным (Мартемьянов, 1988). Это связано с тем, что в начальный период стресса скорость продуцирования мочи существенно возрастает у рыб, компенсируя приток воды в кровь. Так, у радужной форели исходная скорость продукции мочи, равная 1.8 мл/кг ч, увеличилась через 2 ч стресса до 5.8 мл/кг/ч (Hunn, Willford, 1970). У кумжи *Salmo trutta* L. максимальные скорости продуцирования мочи, составляющие 7.5–8.5 мл/кг ч, наблюдались в первые 4 ч стресса, а затем в ходе восстановления стабилизировались на уровне 2.5–3.8 мл/кг/ч (Oduleye, 1975). Показано (Holmes, 1961), что в состоянии стресса диурез может возрастать у лососевых рыб в 10 раз.

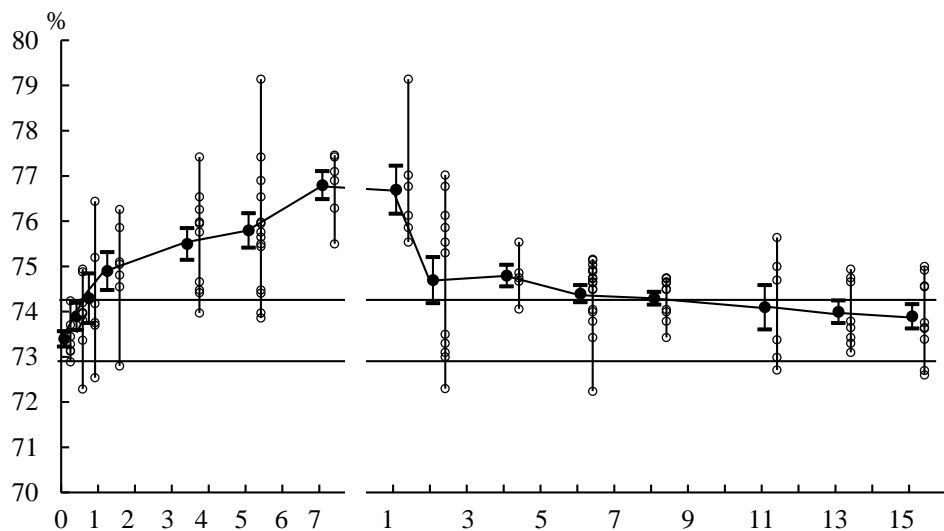


Рис. 5. Динамика содержания воды в организме окуня в ответ на отлов, транспортировку и в ходе адаптации к лабораторным условиям (Мартемьянов, 2015). По оси абсцисс: время — 0–7 ч, 1–15 сут; ординат — содержание воды в организме. Сплошные параллельные линии относительно оси абсцисс — исходный диапазон уровня воды в организме. Черные маркеры — среднее значение \pm стандартное отклонение; светлые маркеры — индивидуальные значения.

Обводнение организма пресноводных гидробионтов в начальный период стресса обуславливается другими причинами. Показано, что различные стрессорные воздействия вызывают в начальный период понижение содержания ионов натрия во внутренней среде пресноводных двустворчатых моллюсков (Виноградов и др., 2004; Martemyanov, 2000), личинок хирономид (Мартемьянов, Шобанов, 1997) и рыб (Мартемьянов, 1983; 2014б; Виноградов, 2000; Kamunde et al., 2005; Postlethwaite, McDonald, 1995; Wood et al., 1996; Yildiz, 2006; Martemyanov, Borisovskaya, 2010; Kelestemur, 2012; Martemyanov, 2015). В начальный период острого стресса у пресноводных рыб зарегистрировано также существенное снижение в плазме крови концентрации ионов хлора (Postlethwaite, McDonald, 1995; Davis, Parker, 1990; Barton et al., 2003; Kamunde et al., 2005). Процесс обессоливания организма пресноводных гидробионтов обусловлен тем, что при стрессе происходит усиление потерь ионов натрия (Мартемьянов, 1983; 2013б; Виноградов, 2000; Виноградов, Клерман, 1987; Мартемьянов, Маврин, 2013; Harley, Glover, 2014) и хлора (Postlethwaite, McDonald, 1995) из крови, главным образом через жабры во внешнюю среду. Определенная часть хлористого натрия теряется из организма с мочой из-за усиления скорости диуреза при стрессе (Holmes, 1961; Hunn, Willford, 1970; Oduleye, 1975).

Уменьшение уровня натрия и хлора в плазме крови пресноводных рыб при остром стрессе сопровождается падением осмоляльности внутренней среды организма (Davis, Parker, 1990; Наточин и др., 1991). В результате между внеклеточной и внутриклеточной жидкостью организма создается перепад осмотического давления, который способствует перемещению воды в клетки, вызывая их разбухание (Мартемьянов, 2014б). Для противодействия вредному процессу, связанному с обводнением тканей, при стрессе усиливаются защитные функции, направленные на снижение концентрации воды в организме, что постепенно стабилизирует водный гомеостаз на исходном уровне (рис. 5).

Таким образом, как показывают полученные данные, повреждение водного гомеостаза наблюдается только в начальный период острого стресса в ответ на резкие воздействия. Это соответствует стадии тревоги по Селье (1972), когда эффекты повреждений и нарушений преобладают над адаптивными процессами, вызывая тем самым снижение уровня резистентности организма (Мартемьянов,

2002; Martemyanov, 2015). Усилившиеся защитные функции, со временем ликвидируя нарушения, снижают и стабилизируют концентрацию воды на исходном уровне, придавая организму повышенную устойчивость (стадия резистентности по Селье).

ПОНЯТИЕ О ГОМЕОСТАЗЕ

Систему циркулирующих жидкостей, омывающих все клетки многоклеточных животных Клод Бернар (Bernard, 1878) назвал «внутренней средой организма». Он же сформулировал идею о существовании постоянства внутренней среды, в которую включают сыворотку (плазму) крови, лимфу, межклеточную и специализированные жидкости — спинномозговую, внутриглазную, полостную, овариальную и другие. Позднее (Cannon, 1929) было предложено понятие «гомеостаз» (греч. *homoios* — такой же, сходный, *stasis* — стабильность, равновесие) для описания совокупности физиологических функций, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма в условиях бесчисленных внешних и внутренних возмущающих воздействий.

В настоящее время имеется множество различных формулировок гомеостаза с теми или иными неопределенностями и противоречивыми дополнениями. Гомеостазом называют процесс, с помощью которого тело поддерживает равновесие в своей внутренней физиологической среде (Кордуэлл, 2000). Другие авторы (Конюхов, 1994) гомеостазом называют относительное динамическое постоянство состава и свойств внутренней среды организма и устойчивость основных его физиологических функций. Головин С.Ю. (1998) гомеостазом называет подвижное равновесное состояние некоей системы, сохраняемое путем ее противодействия, нарушающим равновесие внешним и внутренним факторам. По Крысину (1998) гомеостаз — это совокупность сложных приспособительных реакций организма животного и человека, направленных на устранение или максимальное ограничение воздействия различных факторов внешней или внутренней среды, нарушающих относительное динамическое постоянство внутренней среды организма.

Эти формулировки включают в себя положения, которые не соответствуют критерию гомеостаз (такой же, сходный, постоянный). Как было показано выше, физиологические функции (работа почек) зависят от факторов среды (солености, температуры). Физиологические функции не являются сходными при разных значениях факторов среды. Поэтому их нельзя включать в понятие гомеостаз. Второй момент связан с тем, что в понятие гомеостаз включены бесчисленные внешние и внутренние возмущающие воздействия. С определенной силы такие воздействия вызывают в организме состояние стресса, сопровождающего нарушение показателей гомеостаза (Мартемьянов, 2002).

Таким образом, физиологические функции тесным образом связаны с факторами среды, компенсируя их влияние на организм с целью поддержания параметров гомеостаза на стабильных уровнях. Критерию гомеостаза внутренней среды соответствуют только итоговые константы, поддерживаемые теми или иными физиологическими функциями. Следовательно, гомеостазом следует считать параметры внутренней среды, которые не зависят от факторов среды, у организмов, адаптированных (акклимированных) к различным постоянным условиям внутри толерантных диапазонов. Синонимами гомеостаза являются гомеостазис и равновесие. Все эти синонимы используют ко всей совокупности, группе и отдельным показателям внутренней среды.

Одни ученые (Гиляров, 1986) понятие гомеостаз применяют также по отношению к клетке, другие (Наточин, 2002) считают, что это недопустимо, поскольку в цитоплазме в норме многие показатели существенно изменяются. Мы полагаем, что к отдельным параметрам клетки, которые регулируются в узких пределах независимо от разных постоянных значений факторов внутри их толерантных диапазонов — это понятие применимо, поскольку не противоречит критерию гомеостаза об относительном постоянстве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активность физиологических функций, связанных с работой почек, зависит от факторов среды. Их функционирование направлено на выведение воды из организма пресноводных гидробионтов с целью обеспечения постоянства водного гомеостаза (содержания воды в тканях и организме) во всем интервале того или иного фактора, который вид может перенести. Стрессоры вначале повреждают водный гомеостаз на определенное время, вызывая увеличение уровня воды в организме и тканях. Затем за счет усиления защитных функций организма происходит восстановление и стабилизация параметра на исходном или новом уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
Vinogradov G.A. Protsessy ionnoi regulyatsii u presnovodnykh ryb i bespozvonochnykh. M.: Nauka. 2000. 216 s.

- [Vinogradov G.A. Processes of ionic regulation at freshwater fishes and invertebrata. M.: Science. 2000. 216 p.] In Russian.
- Виноградов Г.А., Клерман А.К. Ионный обмен пресноводных рыб при стрессе // Вопр. ихтиологии. 1987. Т. 27. № 3. С. 307–312. Vinogradov G.A., Klerman A.K. Ionnyi obmen presnovodnykh ryb pri stresse // Vopr. ikhtiologii. 1987. T. 27. № 3. S. 307–312. [Vinogradov G.A., Klerman A.K. Ion exchange of freshwater fish under stress // J. Ichthyology. 1987. Vol. 27. No. 3. P. 307–312.] In Russian.
- Виноградов Г.А., Мартемьянов В.И., Щеглова Н.Б. Влияние экологических факторов на показатели водно-солевого обмена дрейссены *Dreissena polymorpha*. Эффект изменения температуры воды // Биология внутренних вод. 2004. № 1. С. 48–52. Vinogradov G.A., Martemyanov V.I., Shcheglova N.B. Vliyanie ekologicheskikh faktorov na pokazateli vodno-solevogo obmena dreisseny *Dreissena polymorpha*. Effect izmeneniya temperatury vody // Biologiya vnutrennikh vod. 2004. № 1. S. 48–52. [Vinogradov G.A., Martemyanov V.I., Shcheglova N.B. Influence of ecological factors on parameters of water-salt exchange of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Effect of change of water temperature // Inland Water Biology. 2004. No. 1. P. 48–52.] In Russian.
- Гиляров М.С. Биологический энциклопедический словарь. Советская энциклопедия. 1986. 893 с. Gilyarov M.S. Biologicheskii entsiklopedicheskii slovar'. Sovetskaya entsiklopediya. 1986. 893 s. [Gilyarov M.S. Biological Encyclopedic Dictionary. Soviet Encyclopedia. 1986. 893 p.] In Russian.
- Головин С.Ю. Словарь практического психолога. М.: АСТ, Харвест. 1998. 800 с. Golovin S.Yu. Slovar prakticheskogo psikhologa. M.: AST, Harvest. 1998. 800 s. [Golovin S.Yu. The dictionary of the practical psychologist. M.: AST, Harvest. 1998. 800 p.] In Russian.
- Конюхов Н.И. Прикладные аспекты современной психологии: термины, законы, концепции, методы. М.: Макцентр, 1994. 182 с. Konyukhov N.I. Prikladnye aspekty sovremennoi psihologii: terminy, zakony, kontseptsii, metody. M.: Makzentr, 1994. 182 s. [Konyukhov N.I. Applied aspects of modern psychology: the terms, laws, concepts and methods. M.: Makzentr, 1994. 182 p.] In Russian.
- Кордуэлл М. Психология. А–Я. Словарь-справочник. М.: ФАИР-ПРЕСС. 2000. 448 с. Korduell M. Psikhologiya. A–Y. Slovar'-spravochnik. M.: FAIR-PRESS. 2000. 448 s. [Korduell M. Psychology. A-Z. The dictionary-handbook. M.: FAIR-PRESS. 2000. 448 p.] In Russian.
- Краюшкина Л.С., Семенова О.Г., Панов А.А., Герасимов А.А. Функциональные особенности осморегуляторной системы молоди веслоноса *Polyodon spathula* (Polyodontidae) // Вопр. ихтиологии. 1996. Т. 36. № 6. С. 827–833. Krayushkina L.S., Semenova O.G., Panov A.A., Gerasimov A.A. Funktsionalnye osobennosti osmoregulyatornoi sistemy molodi veslonosa *Polyodon spathula* (Polyodontidae) // Voprosy ikhtiologii. 1996. T. 36. № 6. S. 827–833. [Krayushkina L.S., Semenova O.G., Panov A.A., Gerasimov A.A. Functional feature of osmoregulatory system of young paddlefish *Polyodon spathula* (Polyodontidae) // J. Ichthyology. 1996. Vol. 36. No. 6. P. 827–833.] In Russian.
- Крысин Л.П. Толковый словарь иноязычных слов. М: Русский язык. 1998. 847 с. Krysin L.P. Tolkovyi slovar' inoyazychnikh slov. M.: Russkii yazyk. 1998. 847 s. [Krysin L.P. The explanatory dictionary of foreign words. M.: Russian language. 1998. 847 p.] In Russian.
- Лаврова Е.А., Наточин Ю.В. Почки в ионной регуляции у рыб солоноватых вод оз. Балхаш // Вопр. ихтиологии. 1977. Т. 17. № 3. С. 563–566. Lavrova E.A., Natochin Ju.V. Pochki v ionnoi regulyatsii u ryb solonovatykh vod oz. Balkhash // Voprosy ikhtiologii. T. 17. № 3. S. 563–566. [Lavrova E.A., Natochin Ju.V. Kidneys in ionic regulation in fish of brackish water of Lake Balkhash // J. Ichthyology. 1977. Vol. 17. No. 3. P. 563–566.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Динамика концентрации электролитов у пресноводных рыб при стрессе / Пресноводная флора, фауна и биология гидробионтов. Л.: Наука, 1983. С. 237–248. Martemyanov V.I. Dinamika kontsentratsii elektrolitov u presnovodnykh ryb pri stresse / Presnovodnaya flora, fauna i biologiya gidrobiontov. L.: Nauka. 1983. S. 237–248. [Martemyanov V.I. The dynamics of the concentration of electrolytes in freshwater fish under stress / Freshwater flora, fauna and biology of aquatic organisms. L.: Science, 1983. P. 237–248.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Изменение уровня воды и калия в плазме крови леща и плотвы при стрессе // Биол. внутренних вод. Информ. бюлл. 1988. № 78. С. 45–47. Martemyanov V.I. Izmenenie urovnya vody i kaliya v plazme krovi leshcha i plotvy pri stresse // Biol. vnutrennikh vod: Inform. bul. 1988. № 78. S. 45–47. [Martemyanov V.I. Change of water level and potassium in blood plasma of bream and roach under stress // Inland Water Biology: Inform. Bull. 1988. No. 78. P. 45–47.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Стресс у рыб: защитные и повреждающие процессы // Биология внутренних вод. 2002. № 4. С. 3–13. Martemyanov V.I. Stress u ryb: zashchitnye i povrezhdaushchie protsessy // Biologiya vnutrennikh vod. 2002. № 4. S. 3–13. [Martemyanov V.I. Stress in fish: protective and damaging processes // Inland Water Biology. 2002. No. 4. P. 3–13.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Оценка статуса рыб по отношению к солености среды на основе типов осмотической и ионной регуляции // Труды Зоологического института РАН. Приложение № 3. 2013а. С. 175–181. Martemyanov V.I. Otsenka statusa ryb po otnosheniyu k solenosti sredy na osnove tipov osmoticheskoi i ionnoi regulyatsii // Trudy Zoologicheskogo instituta RAN. Prilozhenie № 3. 2013a. S. 175–181. [Martemyanov V.I. Assessment of the status of fish in relation to salinity based on types of osmotic and ionic regulation // Proceed. Zoolog. Institute RAS. Suppl. No. 3. 2013a. P. 175–181.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Методы оценки воздействия неблагоприятных факторов среды на гидробионты по показателям ионного обмена // Вода: химия и экология. 2013б. № 3. С. 52–63. Martemyanov V.I. Metody otsenki vozdeistviya neblagopriyatnykh faktorov sredy na gidrobionty po pokazatelyam ionnogo obmena // Voda: khimiya i

- ecologiya. 2013b. № 3. S. 52–63. [Martemyanov V.I. Methods for assessing the impact of adverse environmental factors on aquatic life in terms of ion exchange // Water: chemistry and ecology. 2013b. No. 3. P. 52–63.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Методы определения общей, свободной и связанной фракций воды в организме и тканях гидробионтов // Вода: химия и экология. 2014а. № 2. С. 86–91. Martemyanov V.I. Metody opredeleniya obshchei, svobodnoi i svyazannoi fraktsii vody v organizme i tkanyakh gidrobiontov // Voda: khimiya i ecologiya. 2014а. № 2. S. 86–91. [Martemyanov V.I. Methods for determination of total, free and bound water fractions in the body and the tissues of aquatic organisms. // Water: chemistry and ecology. 2014а. No. № 2. P. 86–95.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Оценка острого и хронического стресса у пресноводных рыб по показателям водно-солевого обмена // Успехи современной биологии. 2014б. Т.134. № 6. С. 265–273. Martemyanov V.I. Otsenka ostrogo i khronicheskogo stressa u presnovodnykh ryb po pokazatelyam vodno-solevogo obmena // Uspekhi sovremennoi biologii. 2014b. T. 134. № 6. S. 265–273. [Martemyanov V.I. Assessment of acute and chronic stress in freshwater fish based on parameters of water-salt exchange // Biology Bulletin Reviews. 2014b. Vol. 134. No. 6. P. 265–273.] In Russian
- Мартемьянов В.И. Динамика содержания воды в организме окуня *Perca fluviatilis* L. при стрессе // Вода: химия и экология. 2015. № 4. С. 52–55. Martemyanov V.I. Dinamika sodержaniya vody v organizme okunya *Perca fluviatilis* L. pri stresse // Voda: khimiya i ecologiya. 2015. № 4. S. 52–55. [Martemyanov V.I. Dynamics of water content in organism of perch *Perca fluviatilis* L. under stress // Water: chemistry and ecology. 2015. No. 4. P. 52–55.] In Russian.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Влияние меди на ионный обмен у окуня *Perca fluviatilis* L. при пороговых концентрациях катионов в пресной воде // Вода: химия и экология. 2013. № 10. С. 63–67. Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Vliyanie medi na ionnyi obmen u okunya *Perca fluviatilis* L. pri porogovykh kontsentratsiyakh kationov v presnoi vode // Voda: khimiya i ecologiya. 2013. № 10. S. 63–67. [Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Effect of copper on the ion exchange in the perch *Perca fluviatilis* L. at threshold concentrations of cations in the fresh water // Water: chemistry and ecology. 2013. No. 10. P. 63–67.] In Russian.
- Мартемьянов В.И., Шобанов Н.А. Содержание натрия, калия, магния и кальция в гемолимфе личинок рода *Chironomus* // Ж. эволюц. биохимии и физиологии. 1997. Т. 33. № 4-5. С. 443–448. Martemyanov V.I., Shobanov N.A. Soderzhanie natriya, kaliya, magniya i kaltsiya v gemolimfe lichinok roda *Chironomus* // Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. 1997. T. 33. № 4–5. S. 443–448. [Martemyanov V.I., Shobanov N.A. The content of sodium, potassium, magnesium and calcium in the hemolymph of larvae of the genus *Chironomus* // J. Evol. Biochem. Physiol. 1997. V. 33. No. 4–5. P. 443–448.] In Russian.
- Наточин Ю.В. Архитектура физиологических функций: тот же фундамент, новые грани // Росс. физиол. журн. 2002. Т. 88. № 2. С. 129–143. Natochin Yu.V. Arkhitektura fiziologicheskikh funktsii: tot zhe fundament, novye grani // Ross. fiziol. zhurnal. 2002. T. 88. № 2. S. 129–143. [Natochin Yu.V. Architecture physiological functions: the same foundation, new faces // Russian Physiol. J. 2002. Vol. 88. No. 2. P. 129–143.] In Russian.
- Наточин Ю.В., Шахматова Е.И., Лаврова Е.А., Максимович А.А., Карпенко Л.А., Мартемьянов В.И. Волюморегуляция клеток некоторых органов и тканей у пресноводных и проходных рыб при изменении осмоляльности и ионного состава сыворотки крови // Ж. эволюц. биохимии и физиологии. 1991. Т. 27. № 2. С. 159–166. Natochin Yu.V., Shakhmatova E.I., Lavrova E.A., Maksimovich A.A., Karpenko L.A., Martemyanov V.I. Volu-moregulyatsiya kletok nekotorykh organov i tkanei u presnovodnykh i prokhodnykh ryb pri izmenenii osmolyal'nosti i ionnogo sostava syvorotki krovi // Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii. 1991. T. 27. № 2. S. 159–166. [Natochin Yu.V., Shakhmatova E.I., Lavrova E.A., Maksimovich A.A., Karpenko L.A., Martemyanov V.I. Regulation of cell volume of some organs and tissues of freshwater and anadromous fish when changing osmolality and ionic composition of blood serum // J. Evol. Biochem. Physiol. 1991. Vol. 27. No. 2. P. 159–166.] In Russian.
- Пора А.Е., Прекуп О. Об изучении экскреторных процессов у пресноводных рыб. II. Влияние температуры среды на выделительные процессы у карпа и карася // Вопр. ихтиологии. 1960. № 15. С. 138–147. Pora A.E., Prekup O. Ob izuchenii ekskretornikh protsessov u presnovodnykh ryb. II. Vliyanie temperatury sredy na vydelitel'nye protsessy u karpa i karasya // Voprosy ikhtiologii. 1960. № 15. S. 138–147. [Pora A.E., Prekup O. On the study of the excretory processes in freshwater fish. II. Influence of ambient temperature on secretory processes in common carp and goldfish // J. Ichthyology. 1960. No. 15. P. 138–147.] In Russian.
- Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука, 1972. 122 с. Selye G. Na urovne tselogo organizma. M.: Nauka, 1972. 122 s. [Selye G. At level of whole organism. M.: Science, 1972. 122 p.] In Russian.
- Bernard C. Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Paris: Baillièrè, 1878. 404 p.
- Cannon W.B. Organization for physiological homeostasis // Physiol. Rev. 1929. Vol. 9. P. 399–413.
- Catlett R.H., Millich D.R. Intracellular and extracellular osmoregulation of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. // Comp. Biochem. Physiol. 1976. Vol. 55A. No. 3. P. 261–269.
- Barton B.A., Haukenes A.H., Parsons B.G. et al. Plasma cortisol and chloride stress responses in juvenile walleyes during capture, transport, and stocking procedures // N. Amer. J. Aquaculture. 2003. Vol. 65. P. 210–219.
- Bentley P.J., Follett B.K. Kidney function in a primitive vertebrate, the cyclostome *Lampetra fluviatilis* // J. Physiol. 1963. V. 169. P. 902–918.
- Bradbury S.P., McKim J.M., Coats J.R. Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute fenvalerate intoxication // Pest. Biochem. Physiol. 1987. Vol. 27. P. 275–288.
- Davis K.B., Parker N.C. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature // Aquaculture. 1990. Vol. 91. P. 349–358.

- Fromm P.O. Studies on renal and extra-renal excretion in a fresh water teleost, *Salmo gairdneri* // Comp. Biochem. Physiol. 1963. Vol. 10. P. 121–128.
- Furspan P., Prange H.D., Greenwald L. Energetics and osmoregulation in the catfish *Ictalurus nebulosus* and *I. punctatus* // Comp. Biochem. Physiol. 1984. Vol. 77A. P. 773–778.
- Harley R.A., Glover Ch.N. The impacts of stress on sodium metabolism and copper accumulation in a freshwater fish // Aquatic Toxicology 2014. Vol. 147. P. 41–47.
- Hegab S.A., Hanke W. Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stress // Comp. Biochem. Physiol. 1982. Vol. 71A. No. 2. P. 157–164.
- Holmes R.M. Kidney function in migrating salmonids // Rep. Challenger Soc. 1961. Vol. 3. P. 23.
- Hunn J.B., Willford W.A. The effect of anaesthetization and urinary bladder catheterization on renal function of rainbow trout // Comp. Biochem. Physiol. 1970. V. 33. № 4. P. 805–812.
- Isaia J. Comparative effects of temperature on the sodium and water permeabilities of the gills of a stenohaline freshwater fish (*Carassius auratus*) and a stenohaline marine fish (*Serranus scriba*, *Serranus cabrilla*) // J. Exp. Biol. 1972. Vol. 57. No. 2. P. 359–366.
- Janech M.G., Piermarini P.M. Renal water and solute excretion in the Atlantic stingray in fresh water // J. Fish Biology. 2002. Vol. 61. P. 1053–1057.
- Kamunde C.N., Niyogi S., Wood C.M. Interaction of dietary sodium chloride and waterborne copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): copper toxicity and sodium and chloride homeostasis // Can. J. Fish. Aquatic Sci. 2005. Vol. 62. P. 390–399.
- Kelestemur G.T. Effects of hypoxic stress on electrolyte levels of blood in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Iranian J. Fish. Sci. 2012. Vol. 11. P. 930–937.
- Kirk W.L. The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) // Trans. Am. Fish. Soc. 1974. Vol. 103. No. 3. P. 593–600.
- Lahlou B., Henderson I.W., Sawyer W.H. Sodium exchanges in goldfish (*Carassius auratus* L.) adapted to a hypertonic saline solution // Comp. Biochem. Physiol. 1969. Vol. 28. No. 3. P. 1427–1433.
- Mackay W.C. Effect of temperature on osmotic and ionic regulation in goldfish, *Carassius auratus* L. // J. Comp. Physiol. 1974. Vol. 88. P. 1–9.
- Mackay W.C., Beatty D.D. The effect of temperature on renal function in the white sucker fish, *Catostomus commersonii* // Comp. Biochem. Physiol. 1968. Vol. 26. No. 1. P. 235–245.
- Martemyanov V.I. The Dynamics of the sodium, potassium, calcium, magnesium contents in the freshwater mollusk zebra mussel *Dreissena polymorpha* during stress // J. Evol. Biochem. Physiol. 2000. Vol. 36. No. 1. P. 41–46.
- Martemyanov V.I. Influence of environmental mineral composition on the indices of water – salt metabolism in *Dreissena polymorpha* Pallas introduced in the Rybinsk reservoir // Russian Journal Biological Invasions. 2011. Vol. 2. No. 2-3. P. 213–222. DOI: 10.1134/S207511171103009X.
- Martemyanov V.I. Use of body water content to assess the physiological state of roach *Rutilus rutilus* L. in natural conditions // Inland Water Biology. 2013a. Vol. 6. No. 3. P. 246–248. DOI: 10.1134/S1995082913030103.
- Martemyanov V.I. Assessment of the physiological state of the common carp *Cyprinus carpio* L. by the water content in the organism // Inland Water Biology. 2013b. Vol. 6. No. 1. P. 80–84. DOI: 10.1134/S1995082912030091.
- Martemyanov V.I. Stress reaction in freshwater fish in response to extreme impacts and during the reproduction period // J. Coastal Life Medicine. 2015. Vol. 3. No. 3. P. 169–177. doi: 10.12980/JCLM.3.201514J97.
- Martemyanov V.I., Borisovskaya E.V. Indices of hydromineral metabolism in tyulka (*Clupeonella cultriventris*; Clupeiformes, Clupeidae) introduced in the Rybinsk reservoir in comparison to aboriginal and marine fish species // Russian Journal Biological Invasions. 2010. Vol. 1. No. 3. P. 187–193. DOI: 10.1134/S2075111710030082.
- Mazeaud M.M., Mazeaud F., Donaldson E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review // Trans. Amer. Fish. Soc. 1977. Vol. 106. No. 3. P. 201–212.
- Motais B.R., Isaia J. Temperature-dependence of permeability to water and to sodium of the gill epithelium of the eel *Anguilla anguilla* // J. Exp. Biol. 1972. Vol. 56. No. 3. P. 587–600.
- Motais B.R., Isaia J., Rankin J.C., Maetz J. Adaptive changes of the water permeability of the teleostean gill epithelium in relation to external salinity // J. Exp. Biol. 1969. Vol. 51. No. 2. P. 529–546.
- Norton V.M., Davis K.B. Effect of abrupt change in the salinity of the environment on plasma electrolytes, urine volume, and electrolyte excretion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* // Comp. Biochem. Physiol. 1977. Vol. 56A. No. 3. P. 425–431.
- Oduleye S.O. The effects of calcium on water balance of the brown trout, *Salmo trutta* // J. Exp. Biol. 1975. Vol. 63. No. 2. P. 343–356.
- Postlethwaite E.K., McDonald D.G. Mechanisms of Na⁺ and Cl⁻ regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress // J. Exp. Biol. 1995. Vol. 198. P. 295–304.
- Prosser C.L. Comparative animal physiology. Third edition, Philadelphia London Toronto: W.B. Saunders, 1973. 966 p.
- Rao G.M.M. Effect of activity, salinity, and temperature on plasma concentration of rainbow trout // Can. J. Zool. 1969. Vol. 47. P. 131–134.
- Sharratt B.M., Chester Jones I., Bellamy D. Water and electrolyte composition of the body and renal function of the eel (*Anguilla anguilla* L.) // Comp. Biochem. Physiol. 1964. Vol. 11. No. 1. P. 9–18.
- Stevens E.D. Change in body weight caused by handling and exercise in fish // J. Fish. Res. Bd Can. 1972. Vol. 29. No. 2. P. 202–203.

- Umminger B.L. Osmoregulation by the killifish, *Fundulus heteroclitus*, in fresh water at temperatures near freezing // Nature. 1970. Vol. 225. No. 5229. P. 294–295.
- Umminger B.L. Osmoregulatory overcompensation in the goldfish, *Carassius auratus*, at temperatures near freezing // Copeia. 1971a. No. 4. P. 686–691.
- Umminger B.L. Patterns of osmoregulation in freshwater fishes at temperatures near freezing // Physiol. Zool. 1971b. Vol. 44. No. 1. P. 20–27.
- Wendelaar Bonga S. E. The Stress Response in Fish // Physiol. Rev. 1997. Vol. 77. P. 591–625.
- Westfall B.A. Specific gravity of fish blood during rapidly developed anoxia // J. Cell. Comp. Physiol. 1943. Vol. 22. P. 177–186.
- Wikgren J.B. Osmotic regulation in some aquatic animals with special reference to the influence of temperature // Acta Zool. Fenn. 1953. Vol. 71. P. 1–102.
- Wood Ch.M., Hogstrand Ch., F. Galvez, Munger R.S. The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺ // Aquatic Toxicology. 1996. Vol. 35. P. 93–109.
- Yildiz H.Ya. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture // Turk J Vet Anim Sci. 2006. Vol. 30. P. 265–269.

PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF REGULATION OF WATER HOMEOSTASIS IN FRESHWATER ORGANISMS AT ADAPTATION TO ECOLOGICAL FACTORS

V. I. Martemyanov

*I.D. Papanin Institute of the Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
Borok, Yaroslavl oblast, Nekouzskii region, 152742 Russia, e-mail: martem@ibiw.yaroslavl.ru*

Review on physiological mechanisms of regulation of water homeostasis at freshwater organisms at adaptation to various ecological factors is given. It is shown, that activity of the physiological functions connected to work of kidneys, depends on ecological conditions. Their functioning is directed on maintenance of stability of water homeostasis in all interval of this or that factor, which species can adapt. Stress factors in the beginning damage water homeostasis for fixed time, and then by means of intensifying protective functions of organism there is restoration and stabilization of parameter at initial or new level. The critical analysis of concept about homeostasis which is used in physiology is carried out. Based on discussion of the data more clear definition of homeostasis is yielded.

Key words: freshwater organisms, adaptation, regulation, internal environment, physiological functions, water homeostasis.

СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ, КАЛИЯ, КАЛЬЦИЯ, МАГНИЯ И ВОДЫ В КОСТНОЙ ТКАНИ ВПЕРВЫЕ СОЗРЕВШИХ САМОК ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* L. С ГОНАДАМИ IV СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ В РАЗНЫЕ ГОДЫ

А. С. Маврин, В. И. Мартемьянов

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: mavr_as@mail.ru

Установлено, что концентрации натрия и калия в позвонках скелета впервые созревающих самок плотвы в подледный весенний период варьируют в 2009 г. в пределах 50.5–78.3 и 24.7–60.5, в 2011 г. — 40.0–48.7 и 22.4–28.6, в 2013 г. — 16.5–27.8 и 14.1–20.0 ммоль/кг сырой массы ткани соответственно. Содержание кальция и магния у рыб колеблется в 2009 г. в диапазоне 700–1240 и 13.5–34.7, в 2011 г. — 1260–1360 и 41.1–66.9, в 2013 г. — 757–1224 и 39.9–44.5 ммоль/кг сырой массы костной ткани соответственно. Между содержанием Са и Mg, Na и К в позвонках установлена статистически значимая положительная коррелятивная связь ($r_s = 0.75$ и $r_s = 0.91$ соответственно). Уровень общей воды в позвонках варьировал в 2009 г. в диапазоне 56.6–65.7%, в 2011 г. — 51.8–54.9%, в 2013 г. — 50.3–57.7%. Пределы колебаний содержания сухого вещества в позвонках самок плотвы в 2009 г. составляли 34.3–43.4%, в 2011 г. — 45.1–48.2%, в 2013 г. — 42.4–49.8%. Между содержанием сухого вещества в позвонках впервые созревших самок плотвы и концентрацией катионов кальция и магния установлена положительная статистически значимая коррелятивная связь ($r_s = 0.66$ и $r_s = 0.83$ соответственно) и отрицательная с содержанием общей воды.

Ключевые слова: общая вода, натрий, калий, кальций, магний, катионы, накопление, плотва, позвонки, созревание гонад.

ВВЕДЕНИЕ

В индивидуальном развитии позвоночных животных А.Н. Северцов (1939) выделял три периода. С.Г. Крыжановский (1949) онтогенез рыб разделил на четыре периода. Приняв эту классификацию за основу М.И. Шатуновский (1980) индивидуальное развитие рыб подразделил на шесть периодов. Этап половозрелости им был поделен на период достижения половой зрелости и период полового состояния. Такое разделение было основано на данных о накоплении в организме определенного количества биологически активных соединений: витаминов, ферментов, аминокислот и жирных кислот (Шатуновский, 1980). У особей одного поколения, в организме которых не достигнут определенный уровень содержания резервных органических веществ, ооциты протоплазматического роста (II стадия зрелости) не переходят в период трофоплазматического роста (III стадия зрелости) (Шатуновский, Белянина, 1967).

Ресурсы, поступающие в организм, идут с одной стороны, на соматический рост, поддерживающий обмен и на формирование репродуктивных тканей. Важной задачей репродуктивной биологии является изучение процессов накопления органических и минеральных ресурсов необходимых для полового созревания. На высших позвоночных показано (Хрисанфова, Перевозчиков, 2002), что наступление половой зрелости организма зависит от минеральной плотности костной ткани (МПКТ), которая обуславливается минеральными веществами, такими как ионы кальция, магния, натрия, калия. Показано, что в природной воде при концентрации катионов выше пороговых значений, их поступление в организм не лимитируется (Виноградов, 2000; Мартемьянов, Маврин, 2013; 2014; Martemyanov, Mavrin, 2012). Ранее было показано, что зрелые и незрелые самки плотвы, имеющие одинаковые размеры, отличаются по содержанию катионов в позвонках в преднерестовый период (Маврин, Мартемьянов, 2013). В этой работе было высказано предположение, что включение трофоплазматического роста ооцитов (переход гонад на стадию зрелости III) происходит при достижении определенных минимальных концентраций катионов кальция и натрия в позвонках. Являются ли найденные значения уровней катионов в позвонках сходными в разные годы? Наблюдения одного года не дают представление об этом. Необходимо показать пределы колебания концентраций катионов, воды и сухого вещества в позвонках впервые созревших самок плотвы в разные годы.

Цель работы — определение концентрации натрия, калия, кальция, магния, воды и сухого вещества в позвонках впервые созревших самок плотвы с гонадами IV стадии зрелости перед нерестом в разные годы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили впервые созревшие самки плотвы, пойманные в заливе Рыбинского водохранилища, образовавшегося в районе залитого устья реки Ильдь (58°01.002' с.ш., 38°14.385' в.д.). Подледный вылов рыбы был осуществлен в период с 9 марта по 3 апреля 2009 года,

17 апреля 2011 года и 26–27 апреля 2013 года. У каждой особи определяли массу тела с внутренностями с помощью весов ВЛКТ-500 (точность 0.01 г) и измеряли длину тела от начала головы до конца чешуйного покрова (точность 1 мм). Стадию зрелости определяли по шкале зрелости яичников (Мейен, 1939). Всего было исследовано 32 самки с гонадами IV стадии зрелости. Определение катионов в телах позвонков (далее позвонки) проводили методом пламенной спектрофотометрии. Для этого брали 2–4 позвонка из туловищного отдела позвоночника. Озоление позвонков, определение содержания ионов в пробах проводили по ранее описанной методике (Мартемьянов, 1992). Концентрацию катионов в позвонках выражали в ммоль/кг сырой массы ткани. Определение общей воды в позвонках рыб проводили по ранее описанной методике (Мартемьянов, 2014). Содержание сухого вещества в позвонках оценивали по разности между общей массой и водой, выражали в % от общей массы. Статистическая и графическая обработка данных проведена с помощью прикладных программ MS Office Excel 2010, Statistica 6.0. Связь между содержанием катионов и воды в позвонках определяли с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). Результаты представлены в виде средних и их ошибок. Оценка достоверности проведена для уровня вероятности $P=0.05$ по U-критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вариабельность (коэффициент вариации) длины и массы у впервые созревших самок плотвы в 2009 году была 7% и 23%, в 2011 году — 6.9% и 21.3%, в 2013 году — 5.4% и 17% соответственно. Разница между крупными и мелкими самками плотвы составила в 2009 г. — 25 мм и 19.1 г, в 2011 г. — 22 мм и 16 г, в 2013 г. — 16 мм и 11.6 г соответственно (таблица). Самки, созревшие в 2009 и 2011 гг. имеют сходные размерно-массовые показатели. У созревших в 2013 году наблюдается сужение диапазонов и снижение коэффициентов вариации длины и массы. Процесс вителлогенеза у самок, пойманных в 2009 году, проходил летом 2008 года, у самок, пойманных в 2011 г. — летом 2010 года, у самок 2013 года — в 2012 году. Следует отметить, что поколения самок пойманных в 2009 и 2011 гг. появились, развивались и росли в стабильных условиях среды характерных для ряда предыдущих лет. Поколение, исследованное в 2013 г., появилось, развивалось и росло при аномально высоких летних температурах 2010 и 2011 гг. Снижение вариабельности размерно-массовых показателей в 2013 году может свидетельствовать о направленном действии температуры воды и других факторов на физиологические процессы, связанные с развитием и ростом рыб. Вероятной причиной уменьшения размеров рыб, в таких условиях, может быть другой уровень функционирования биохимических систем организма, ускоренное развитие и раннее половое созревание. Другая причина — низкое содержание калия в тканях рыб. Показано (Спирин и Гаврилова, 1971), что недостаток калия в организме замедляет работу белок-синтезирующей системы, в результате задерживается соматический рост.

Диапазоны значений изучаемых показателей в разные годы

гг.	n	Длина, мм	Масса, г	Содержание ионов, ммоль/кг сырой массы ткани				Вода общ., %	Сухое в-во, %
				Натрий	Калий	Кальций	Магний		
2009	12	102–127	16.6–35.7	50.5–78.3	24.7–60.5	700–1240	13.5–34.7	56.6–65.7	34.3–43.4
2011	9	101–123	17.8–33.8	40.0–48.7	22.4–28.6	1260–1360	41.1–66.9	51.8–54.9	45.1–48.2
2013	11	99–115	15.7–27.3	16.5–27.8	14.1–20.0	757–1224	39.9–44.5	50.3–57.7	42.4–49.8

Содержание катионов в позвонках самок плотвы разных поколений достоверно отличалось между собой. Диапазоны колебания концентраций Na в позвонках зрелых самок не перекрываются в разные годы (табл. 1). Высокие концентрации Na, K, воды и низкие уровни кальция и магния в позвонках установлены в 2009 и 2011 гг. (рис. 1, 2). Резкое изменение факторов среды может приводить к изменению жизненных стратегий организмов (MacArthur, Wilson, 1967; Pianka, 1970). В процессе раннего развития и роста у отдельных особей формируются новые свойства, позволяющие быстро адаптироваться, конкурировать за пищевые ресурсы и осваивать новые биотопы. Возможно, что жизненная стратегия рыб определяется на ранних этапах развития уже в первый год их жизни, когда происходит развитие половых клеток, дифференцировка пола, формируется потенциальная плодовитость и резервный фонд половых клеток будущего потомства. Вероятно, что половозрелые самки 2009 и 2011 гг. реализуют преимущественно K-стратегию, направленную на позднее половое созревание при крупных размерах тела и увеличение продолжительности жизни (MacArthur, Wilson, 1967; Pianka, 1970). Такая стратегия осуществляется в условиях стабильности или плавного изменения условий обитания. Высокие уровни Ca и Mg в позвонках зрелых самок в 2011 году являются исклю-

чением из общей тенденции увеличения содержания двухвалентных ионов при снижении концентраций одновалентных катионов в позвонках от 2009 к 2013 году (рис. 1). Мы предполагаем, что это обусловлено действием высоких температур на скорость накопления двухвалентных катионов в год, когда начался трофоплазматический рост ооцитов (III стадия зрелости), т.е. летом 2010 года.

Рождение, развитие и ювенильный рост поколения зрелых самок, отловленных в 2013 году, происходили в период аномально высоких летних температур воды, теплой осени и зимы 2010 года. Вероятной причиной снижения концентрации катионов Na, K, воды и увеличения Ca и Mg в позвонках этой плотвы, по сравнению с особями, выловленными в 2009 г., может быть влияние отбора особей с r-стратегией в ранние периоды развития молоди рыб (MacArthur, Wilson, 1967; Pianka, 1970), направленного на уменьшение размеров рыб при первом созревании. При такой стратегии ускоряется рост, увеличивается максимальное число мелких потомков, продуктивность и снижается продолжительность жизни.

Другими возможными причинами разного уровня катионов в позвонках может быть разная скорость поступления и накопления в годы предыдущие половому созреванию, зависящая от внешних и внутренних факторов. Расходование накопленных катионов из костной ткани рыб может меняться в зависимости от концентрации растворенного в воде углекислого газа и повышения его уровня в организме рыб в зимний подледный период. Ранее было показано, что при гиперкапнии происходит перераспределение катионов между тканями для поддержания стабильности внутренней среды организма (Романенко, Крисальный, 1977). Высокий уровень двухвалентных катионов в позвонках самок в 2011 г. может быть обусловлен меньшим расходом минеральных ресурсов в организме в связи с благоприятным газовым режимом рек в результате позднего ледостава в 2010 году.

Содержание Na и K, Ca и Mg в позвонках самок плотвы в годы исследований изменялось синхронно. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих катионов показал сильную положительную связь ($r_s = 0.91$, $r_s = 0.75$), указывая на их функциональную зависимость.

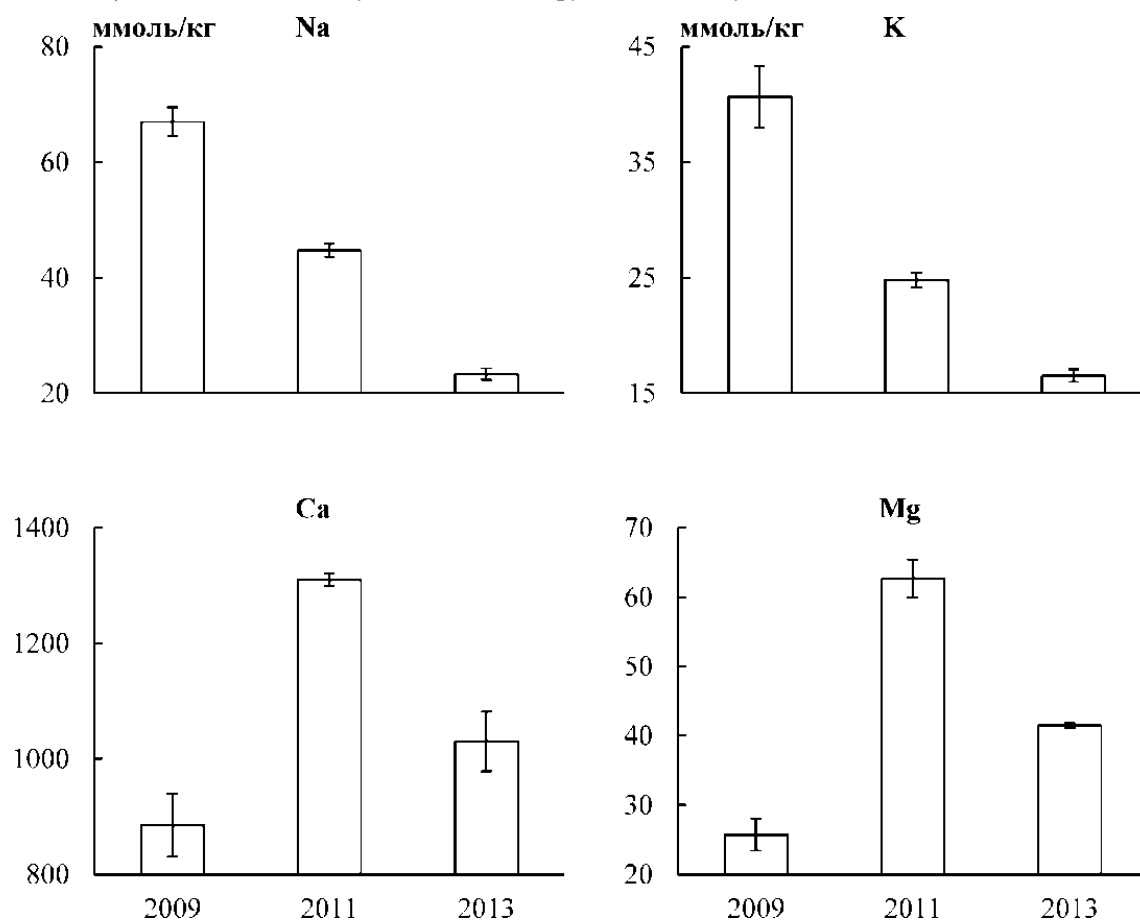


Рис. 1. Концентрация катионов в позвонках самок плотвы в разные годы.

Содержание воды в позвонках самок плотвы весной 2009 года было на 8.7% и 6.6% больше, чем в 2011 и 2013 годах (рис. 2), а содержание сухого вещества меньше. Сухое вещество характеризует общее содержание органических и минеральных ресурсов в организме. Чем меньше накоплено ресурсов в организме, тем меньше шансов для переживания неблагоприятных условий. Возможно,

самки плотвы в ходе зимовки 2008–2009 гг. израсходовали больше ресурсов из костной ткани на поддержание жизнедеятельности. Самое высокое содержание сухого вещества в позвонках зрелых самок плотвы после зимовки в 2011 году (рис. 2), свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии этих рыб и благоприятных для них условиях в зимний, подледный период. Между содержанием общей воды в позвонках впервые созревших самок плотвы и концентрацией катионов кальция и магния установлена отрицательная статистически значимая коррелятивная связь ($r_s = -0.66$ и $r_s = -0.83$ соответственно) и положительная с содержанием сухого вещества.

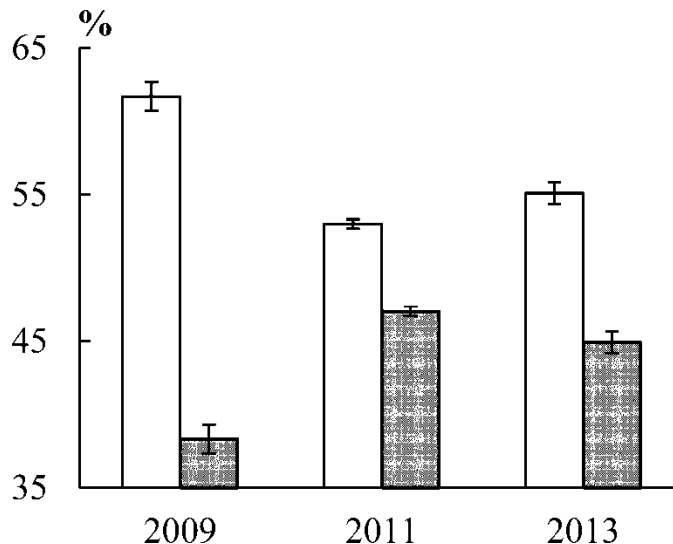


Рис. 2. Содержание воды и сухого вещества в позвонках впервые созревающих самок плотвы весной в разные годы. Легенда: столбики без штриховки — вода, со штриховкой — сухое вещество.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Содержание катионов в позвонках впервые созревших самок плотвы с гонадами в IV стадии зрелости в подледный период весны 2009, 2011 и 2013 гг. различалось. Самые высокие концентрации ионов Na и K были у рыб в 2009 году. В последующие 2011 г. и 2013 г. наблюдалось их снижение: в 1.5 и 2.9 раза для натрия, в 1.6 и 2.5 раза для калия. Диапазоны колебания концентраций Na в позвонках зрелых самок в разные годы не перекрываются. Содержание Ca и Mg в 2009 г. было низким, в последующие 2011, 2013 годы наблюдалось их увеличение в 1.5, 1.3 и 2.4, 1.5 раза соответственно. Между содержанием Na и K, Ca и Mg в позвонках установлена статистически значимая положительная коррелятивная связь ($r_s = 0.91$ и $r_s = 0.75$ соответственно). Высокое содержание сухого вещества в позвонках зрелых самок плотвы после зимовки в 2011 году свидетельствует о хорошем физиологическом состоянии этих рыб и благоприятных для них условиях в зимний подледный период. Между содержанием сухого вещества в позвонках впервые созревших самок плотвы и концентрацией катионов Ca и Mg установлена положительная статистически значимая коррелятивная связь ($r_s = 0.66$ и $r_s = 0.83$ соответственно) и отрицательная с содержанием общей воды. Полученные данные свидетельствуют об изменчивости показателей минерального обмена созревающих самок в разные годы. Наряду с накоплением минеральных ресурсов происходит их трата из костной ткани на переживание неблагоприятных условий. Одной из вероятных причин изменчивости исследованных показателей впервые созревших самок плотвы при резком изменении температуры воды и других, сопряженных с ней факторов, является отбор особей с r-стратегией в первый год жизни рыб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградов Г.А. Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных. М.: Наука, 2000. 216 с.
 Vinogradov G.A. Protsessy ionnoi regulyatsii u presnovodnykh ryb i bespozvonochnykh. M.: Nauka, 2000. 216 s.
 [Vinogradov G.A. Processes of ionic regulation in freshwater fish and invertebrates. M.: Science, 2000. 216 p.] In Russian.
- Маврин А.С., Мартемьянов В.И. Содержание катионов в позвонках зрелых и незрелых самок плотвы *Rutilus rutilus* (L.) перед нерестом // Труды Зоологического института РАН. 2013. Т. 317. Приложение № 3. С. 151–154.
 Mavrin A.S., Martemyanov V.I. Soderzhanie kationov v pozvonkakh zrelykh i nezrelykh samok plotvy *Rutilus rutilus* (L.) pered nerestom // Trudy Zoologicheskogo instituta RAN. 2013. T. 317. Prilozhenie № 3. S. 151–154.
 [Mavrin A.S., Martemyanov V.I. The content of cations in vertebrae of the mature and immature females of roach *Rutilus rutilus* (L.) before spawning // Proceedings of the Zoological Institute of the RAS. 2013. Vol. 317. Supplements No. 3. P. 151–154.] In Russian.

- Мартемьянов В.И. Содержание катионов в плазме, эритроцитах и мышечной ткани рыб Волжского плеса Рыбинского водохранилища // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1992. № 28(5). С. 576–581. Martem'yanov V.I. Soderzhanie kationov v plazme, eritrotsitakh i myshechnoi tkani ryb Volzhskogo plesa Rybinskogo vodokhranilishcha // Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii. 1992. № 28(5). С. 576–581. [Martemyanov V.I. The content of cations in plasma, erythrocytes and muscle tissue of fish of the Volga reach of the Rybinsk reservoir // J. Evolution. Biochem. Physiol. 1992. No. 28(5). P. 576–581.] In Russian.
- Мартемьянов В.И. Методы определения общей, свободной и связанной фракций воды в организме и тканях гидробионтов // Вода: химия и экология. 2014. № 2. С. 86–91. Martem'yanov V.I. Metody opredeleniya obshchei, svobodnoi i svyazannoi fraktsii vody v organizme i tkanyakh gidrobiontov // Voda: khimiya i ekologiya. 2014. № 2. S. 86–91. [Martemyanov V.I. Methods of determination of total water, free water fraction, and attached water fraction in the organism and tissues of hydrobionts // Water: chemistry and ecology. 2014. No. 2. P. 86–95.] In Russian.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Влияние меди на ионный обмен у окуня *Perca fluviatilis* L. при пороговых концентрациях катионов в пресной воде // Вода: химия и экология. 2013. № 10. С. 63–67. Martem'yanov V.I., Mavrin A.S. Vliyanie medi na ionnyi obmen u okunya *Perca fluviatilis* L. pri porogovykh kontsentratsiyakh kationov v presnoi vode // Voda: khimiya i ekologiya. 2013. № 10. S. 63–67. [Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Copper influence on ion exchange of perch *Perca fluviatilis* L. under threshold concentrations of cations in fresh water // Water: chemistry and ecology. 2013. No. 10. P. 63–67.] In Russian.
- Мартемьянов В.И., Маврин А.С. Пороговые концентрации катионов во внешней среде определяющие границы распространения гольяна *Phoxinus phoxinus* L. в пресных водоемах // Вода: химия и экология. 2014. № 7. С. 115–118. Martem'yanov V.I., Mavrin A.S. Porogovye kontsentratsii kationov vo vneshnei srede opredelyayushchie granitsy rasprostraneniya gol'yana *Phoxinus phoxinus* L. v presnykh vodoemakh // Voda: khimiya i ekologiya. 2014. № 7. S. 115–118. [Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Threshold concentrations of cations in the external environment defining the spread boundaries of the minnow *Phoxinus Phoxinus* L. in fresh water // Water: chemistry and ecology. 2014. No. 7. P. 115–118.] In Russian.
- Мейен В.А. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб // Изв. АН СССР. Отдел биол. наук. 1939. № 3. С. 389–420. Meyen V.A. K voprosu o godovom tsikle izmenenii yaichnikov kostistyykh ryb // Izv. AN SSSR. Otdel. biol. nauk. 1939. № 3. S. 389–420. [Meyen V.A. To the question of the annual cycle of changes in ovary of bony fish // Biology Bulletin. 1939. No. 3. P. 389–420.] In Russian.
- Пианка Э. Эволюционная экология. Под ред. М.С. Гилярова. 1981. М.: Мир. 400 с. Pianka E.H. Evolyutsionnaya ekologiya. Pod red. M.S. Gilyarova. 1981. M.: Mir. 400 s. [Pianka E. R. Evolutionary Ecology. Second Edition. New York: Harper and Row, 1978. 397 p.] In Russian.
- Романенко В.Д., Крисальный В.А. Некоторые особенности ионного обмена у рыб при адаптации их к повышенному содержанию CO₂ в воде. // Гидробиол. журн. 1977. № 2. С. 83–86. Romanenko V.D., Krisal'nyi V.A. Nekotorye osobennosti ionnogo obmena u ryb pri adaptatsii ikh k povyshennomu sodержaniyu CO₂ v vode. // Gidrobiol. zhurn. 1977. № 2. S. 83–86. [Romanenko V.D., Krisal'nyi V.A. Some features of ion exchange in fish during adaptation to high concentration of CO₂ in the water // Hydrobiological J. 1977. No. 2. P. 83–86.] In Russian.
- Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. 1939. М.: Изд-во АН СССР. 139 с. Severtsov A.N. Morfologicheskie zakonomernosti evolyutsii. 1939. M.: Izd-vo AN SSSR. 139 s. [Severtsov A.N. Morphological patterns of evolution. 1939. Moscow: Publisher of USSR Academy of Sciences. 139 p.] In Russian.
- Спирин А.С., Гаврилова Л.П. Рибосома. 1971. М.: Наука. 254 с. Spirin A.S., Gavrilova L.P. Ribosoma. 1971. M.: Nauka. 254 s. [Spirin A.S., Gavrilova L.P. The ribosome. 1971. Moscow: Science. 254 p.] In Russian.
- Хрисанфова Е.Н., Перевозчиков И.В. Антропология. 2002. МГУ. М.: Высшая школа. 267 с. Khisanfova E.N., Perevozchikov I.V. Antropologiya. 2002. MGU. M.: Vysshaya shkola. 267 s. [Hrisanfova E.N., Perevozchikov I.V. Anthropology. 2002. MSU. Moscow: High school. 267 p.] In Russian.
- Шатуновский М.И., Белянина Т.Н. Созревание и плодовитость рыб в пределах поколений в связи с их физиологической неоднородностью / Обмен веществ и биохимия рыб. 1967. М.: Наука. С. 38–44. Shatunovskiy M.I., Belyanina T.N. Sozrevanie i plodovitost' ryb v predelakh pokolenii v svyazi s ikh fiziologicheskoi neodnorodnost'yu / Obmen veshchestv i biokhimiya ryb. 1967. M.: Nauka. S. 38–44. [Shatunovsky M.I., Belyanina T.N. Maturation and fecundity of fish within generations due to their physiological heterogeneity / Metabolism and biochemistry of fish. 1967. Moscow: Science. P. 38–44.] In Russian.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. 1980. М.: Наука. 288 с. Shatunovskiy M.I. Ekologicheskie zakonomernosti obmena veshchestv morskikh ryb. 1980. M.: Nauka. 288 s. [Shatunovsky M.I. Ecological patterns of metabolism of marine fish. 1980. Moscow: Science. 288 p.] In Russian.
- Шатуновский М.И. Эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза рыб. / Экологические проблемы онтогенеза рыб: физиолого-биохимические аспекты. 2001. М.: Изд-во МГУ. С. 13–19. Shatunovskiy M.I. Ekologo-fiziologicheskie podkhody k periodizatsii ontogeneza ryb / Ekologicheskie problemy ontogeneza ryb: fiziologo-biokhimicheskie aspekty. 2001. M.: Izd-vo MGU. S. 13–19. [Shatunovskiy M.I. Ecological and physiological approaches to the periodization of the ontogeny of fish / Environmental problems in the ontogeny of fish: physiological and biochemical aspects. 2001. Moscow: MGU. P. 13–19.] In Russian.
- Carragher J.F., Sumpter J.P. The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin // Comp. Biochem. Physiol. 1991. Vol. 99A. No. 1/2. P. 169–172.
- Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. Oxford: Clarendon Press, 1930. 272 p.

MacArthur R.H., Wilson E.O. The theory of island biogeography. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press, 1967. 203 p.
Martemyanov V.I., Mavrin A.S. Threshold environmental concentrations of cations defining the range of roach *Rutilus rutilus* L. in freshwater reservoirs // Inland Water Biology. 2012. Vol. 5. No. 1. P. 91–95.
Pianka E.R. On *r* and *K* selection // Amer. Natur. 1970. Vol. 104. P. 592–597.

THE CONTENT OF SODIUM, POTASSIUM, CALCIUM, MAGNESIUM, AND WATER IN BONE TISSUE OF FIRST RIPENING FEMALE OF ROACH *RUTILUS RUTILUS* L. WITH GONADS AT MATURITY STAGE IV IN DIFFERENT YEARS

A. S. Mavrin, V. I. Martem'yanov

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: mavr_as@mail.ru*

Concentrations of sodium and potassium in vertebrae of female roach, which matured for the first time, were measured during the spring period of ice cover and varied in 2009 within 50.5–78.3 and 24.7–60.5, in 2011 — 40.0–48.7 and 22.4–28.6, and in 2013 — 16.5–27.8 and 14.1–20.0 mmol/kg bone tissue wet mass respectively. The content of calcium and magnesium in fish in 2009, 2011 and 2013 ranged within 700–1240 and 13.5–34.7, 1260–1360 and 41.1–66.9, 757–1224 and 39.9–44.5 mmol/kg wet mass of bone tissue respectively. Statistically significant positive correlations between concentrations of Ca and Mg, Na and K in vertebrae are established ($r_s = 0.75$ и $r_s = 0.91$ respectively). The total water content of bone tissue ranged from 56.6 to 65.7% in 2009, from 51.8 to 54.9% in 2011, and from 50.3 to 57.7% in 2013. Dry matter content of vertebrae in 2009, 2011, and 2013 varied within 34.3–43.4%, 45.1–48.2%, and 42.4–49.8% respectively. Statistically significant positive correlations are established between the dry matter content of vertebrae in female roach, matured for the first time, calcium and magnesium cation concentrations ($r_s = 0.66$ и $r_s = 0.83$ respectively) and a negative one between the dry matter and total water content.

Keywords: total water, sodium, potassium, calcium, magnesium, cations, accumulation, roach, vertebrae, gonad maturity

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРЭСНОВОДНОЙ КОСТИСТОЙ РЫБЫ *ABRAMIS BRAMA L.* ИЗ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Г. М. Чуйко, Е. И. Головкина, В. А. Подгорная

Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанова РАН,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: gko@ibiw.yaroslavl.ru

Определена относительная масса и изучена сезонная динамика активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и содержание белка различных отделов головного мозга у типичного представителя ихтиофауны средних широт костистой рыбы леща (*Abramis brama L.*). Установлено, что отделы мозга отличаются по всем исследованным параметрам. Наименьшая относительная масса и значения обоих биохимических показателей отмечены для переднего мозга, наивысшие — для объединенных среднего и промежуточного. При этом содержание белка в остальных отделах такое же высокое как в среднем и промежуточном мозге. Активность АХЭ и содержание белка во всех отделах мозга демонстрируют сезонную цикличность. В целом наибольшие значения обоих показателей отмечены для периода с мая по июнь, хотя для каждого отдела имеются свои особенности.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, белок, относительная масса, отделы мозга, сезонная динамика, лещ (*Abramis brama*), Рыбинское водохранилище.

ВВЕДЕНИЕ

В жизни рыб существенное значение имеют их взаимоотношения со средой обитания, которая характеризуется постоянной изменчивостью. Изменения большинства естественных факторов окружающей среды имеют сезонную цикличность, что особенно ярко проявляется в средних и северных широтах. Приспособление рыб к жизни в условиях циклических изменений среды осуществляется путем синхронизации их биологических ритмов с природными циклами. Организм на изменение среды обитания обычно отвечает той или иной физиологической или биохимической реакцией, носящей адаптивный характер (Хочачка, Сомеро, 1977; Хлебович, 1981; Hochachka, Somero, 2002). Каждый период биологического цикла характеризуются специфическими физиолого-биохимическими особенностями состояния организма. Изучение этих особенностей для всего цикла и в отдельные его периоды является одной из важных задач ихтиологии и экологической физиологии и биохимии рыб (Шульман, 1972; Шатуновский, 1980).

Ацетилхолинэстераза (АХЭ; КФ 3.1.1.7) — фермент, играющий важную роль в синаптической передаче нервного импульса в холинергической нервной системе и широко распространенный в живой природе от микроорганизмов до млекопитающих (Taylor, 1991; Kozlovskaya, Chuyko, 1993; Morgalev, Rozengart, 2006). Участие АХЭ и холинергической системе мозга показано во многих жизненно важных процессах у рыб: в регуляции пищевого (Pavlov et al., 1992) и репродуктивного поведения (Pavlov, 1994b), формировании стресс-ответа (Хайдарлиу и др., 1987; Чуйко и др., 2011; Pavlov et al., 1994;), процессах дыхания (Pavlov, 1994a) и терморегуляции (Crawshaw, Wollmuth, 1992; Голованов и др., 2015), работе зрительного (Гдовский, Ружинская, 1990; Ekstrom, Korf, 1986; Ekstrom, 1987) и обонятельного анализаторов (Ружинская, Гдовский, 1992; Ружинская и др., 1990), регуляции сердечного ритма (Копылова и др., 1990) и др. Известно также, что активность АХЭ варьирует в зависимости от отдела мозга рыб (Лейбсон, 1963; Хайдарлиу и др., 1984; 1985; Francis, Schechter, 1980; Гдовский, Ружинская, 1990).

Кроме того, последние десятилетия активность АХЭ мозга рыб широко используется для диагностики их отравления фосфорорганическими и карбаматными пестицидами и в качестве биомаркера загрязнения окружающей среды данными веществами (Kirby et al., 2000; Triebkorn et al., 2001; Wijeyaratne, Pathiratne, 2006). Биомаркеры являются одним из инструментов, позволяющих оценить влияние антропогенного загрязнения и других экзогенных природных факторов на водные организмы и экосистемы (Лукиянова, 2001; Чуйко, 2014). Однако для более эффективного применения биомаркеров необходимо знать диапазон их биологической изменчивости, включая сезонные циклы.

Учитывая значимую роль, которую играет АХЭ в функционировании холинергической системы, широкий спектр физиологических функций, находящихся под холинергическим контролем, а также использование её в качестве биомаркера становится очевидной необходимостью изучения сезонной динамики фермента в разных отделах мозга рыб.

Вместе с тем, сезонные циклы активности АХЭ в мозге рыб изучены недостаточно. Имеющиеся по этому вопросу работы немногочисленны, касаются лишь целого мозга, охватывают неполный

годовой цикл и выполнены на ограниченном числе теплолюбивых видов сем. Centrarchidae (Edwards, 1971a, b), Cyprinodontidae (Baslow, Nigrelli, 1964), Poeciliidae (Menéndez-Helman et al., 2015) и Clupeidae (Nunes et al., 2015), имеющих ареал распространения в южных широтах. Для рыб средних широт такие работы выполнены для окуня *Perca fluviatilis* L. (Чуйко, Козловская, 1989) и плотвы *Rutilus rutilus* L. (Chuiko et al., 1997). Сезонная вариабельность активности АХЭ в различных отделах мозга не исследована вообще.

Цель работы — изучение сезонной динамики активности АХЭ и содержания водорастворимого белка в различных отделах головного мозга у типичного представителя ихтиофауны средних широт костистой рыбы леща *Abramis brama* L (сем. Cyprinidae).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рыб для исследования отлавливали неводом в Волжском плесе Рыбинского водохранилища (58° 05' с.ш., 38° 16' в.д.) с марта 2008 по июль 2009 гг. В работе использовано 107 экземпляров визуально здоровых, свободных от паразитов ювенильных и половозрелых особей обоего пола в равном соотношении. В таблице приведены данные размерно-массовых характеристик и число исследованных рыб в каждом месяце.

Размерно-массовые характеристики леща (*Abramis brama* L) Волжского плеса Рыбинского водохранилища

Месяц	n	Средняя длина, см	Средняя масса, г
10.03.2008	16	24.6	218.3
24.04.2008	11	38.0	860.6
05.05.2008	10	38.4	824.6
19.06.2008	10	40.5	1053.2
07.08.2008	10	36.0	886.9
25.09.2008	10	30.1	279.4
30.10.2008	10	23.3	245.3
20.05.2009	10	35.8	980.9
19.06.2009	10	38.4	1077.4
16.07.2009	10	36.9	1072.4

После отлова рыбу доставляли в лабораторию, проводили биологический анализ, извлекали мозг, делили его на отделы (рис.1), взвешивали, помещали в герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры объемом 1.5–5 мл, замораживали при температуре -18°C до начала биохимического анализа (не более 10 дней). Передний мозг выделяли без обонятельных луковиц, поскольку у леща они вынесены в переднюю часть головы и располагаются в области ноздрей. Для среднего и промежуточного мозга использовали объединённую пробу, т.к. их разделение по морфо-анатомическим признакам визуально затруднительно.

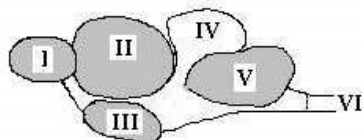


Рис. 1. Отделы головного мозга леща: I — передний мозг; II — средний мозг; III — промежуточный мозг; IV — мозжечок; V — продолговатый мозг; VI — спинной мозг.

Перед анализом пробы мозга размораживали и гомогенизировали 3 минуты тefлоновым пестиком в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма с электроприводом. К навеске ткани добавляли 0.1 М фосфатный буфер с рН 7.5 в соотношении 1:10 (вес/объем). Гомогенаты центрифугировали при 15000 тыс. об/мин (12000g) и $t = 0^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. Для биохимического анализа использовали супернатант, который разводили в 5 раз, конечное разведение проб равнялось 1:8800 (масса/объем).

Активность АХЭ определяли на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, Швейцария) методом Элмана (Ellman et al., 1961) в собственной модификации (Chuiko, 2000) при длине волны 412 нм, температуре 30°C и времени инкубации 20 мин. Использовали иодид ацетилтиохолина (АТХ) в качестве субстрата и дитионитробензойную кислоту (ДТНБ) в качестве окрашивающего агента (оба реактива производства Sigma Company, USA). Активность АХЭ выражали в мкмоль/мин на 1 г сырой ткани. Молярная экстинкция ДТНБ равнялась 14823. Содержание белка определяли спектрофотометрически методом Брэдфорд (Bradford, 1976) при длине волны 595 нм по калибровочным графикам, используя в качестве стандарта раствор альбумина (0.25–0.5 мг/мл) сыворотки крови человека (Reanal, Hungary) и выражали в мкг/мг ткани. При определении пробу разводили в 5 раз. Рассчитывали средние значения (\bar{x}) и их ошибки (m_x). Достоверность результатов оценивали по критерию Стью-

дента (t) при $p=0.05$. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statgraphics Plus 2.1 и Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлены достоверные устойчивые отличия относительной массы различных отделов мозга леща (рис. 2). Наибольшее значение отмечено для среднего и промежуточного мозга (42%), наименьшее — для переднего (9%).

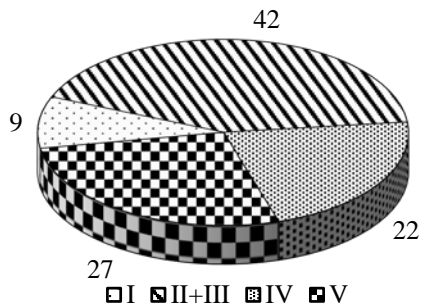


Рис. 2. Относительная масса различных отделов головного мозга леща, % от массы целого мозга: I — передний мозг; II+III — средний и промежуточный мозг; IV — мозжечок; V — продолговатый мозг.

Величины активности АХЭ в разных отделах мозга леща также различались. Максимальные значения (11.33 мкмоль/г/мин) зарегистрированы в среднем и промежуточном мозге, минимальные (3.85 мкмоль/г/мин) — переднем. Наибольшие различия достигали 3-х раз (рис. 3а).

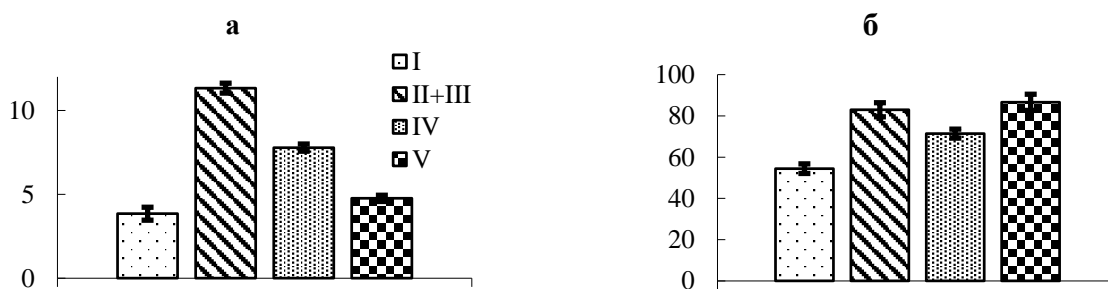


Рис. 3. Удельная активность АХЭ (а) и среднее содержание белка (б) в различных отделах мозга леща: по оси ординат — активность АХЭ, мкмоль/г/мин, среднее содержание белка, мг/г; по оси абсцисс — отделы головного мозга: I — передний мозг; II+III — средний и промежуточный мозг; IV — мозжечок; V — продолговатый мозг.

Содержание белка варьировало в зависимости от отдела мозга, но в меньшей степени, чем активность АХЭ (рис. 3б). Различия достигали 1.5 раз, при этом минимальные значения (54.4 мг/г) отмечены в переднем мозге, а максимальные (86.6 мг/г) — в объединенных среднем и промежуточном мозге, а также продолговатом мозге. В мозжечке содержание белка имело промежуточное значение.

В течение года во всех отделах мозга динамика активности АХЭ и содержания белка демонстрировала четко выраженную сезонную цикличность. Сравнение результатов в разные годы показало, что общий характер сезонной динамики обоих показателей сохранялся.

В переднем мозге активность АХЭ (рис. 4а) достоверно возрастала, начиная с марта, и достигала наивысших годовых значений в мае. В летние месяцы уровень активности оставался постоянным и достаточно высоким, к осени достоверно снижался. Сезонная динамика содержания белка имела сходный с активностью фермента характер, но его более высокий, чем весной, уровень оставался и в осенний период (рис. 5а). При этом значения обоих показателей в 2008 г. были немного ниже, чем в 2009 г.

В объединенных среднем и промежуточном мозге активность АХЭ постепенно повышалась в весенние месяцы, достигая достоверно наибольшего значения в июне в 2008 г. и в мае в 2009 г. (рис. 4б). В летние месяцы уровень активности оставался постоянным и достаточно высоким, к осени снижался. В целом активность АХЭ в 2008 г. достоверно выше, чем в 2009 г. Содержание белка весной возрастало, в мае и летом достигало достоверно наивысших значений, к осени снижалось (рис. 5б). Различий между данными 2008 г. и 2009 г. не наблюдалось.

В мозжечке уровень активности АХЭ (рис. 4в) и содержание белка (рис. 5в) достоверно возрастали в весенний период, достигая наивысших значений в мае. Летом уровень обоих показателей постоянный и достаточно высокий, к осени снижался. Межгодовых различий в активности фермента в 2008 и 2009 г. не выявлено. Уровень содержания белка 2008 г. были несколько ниже, чем 2009 г.

В продолговатом мозге динамика обоих показателей наиболее близка к наблюдаемой в переднем мозге.

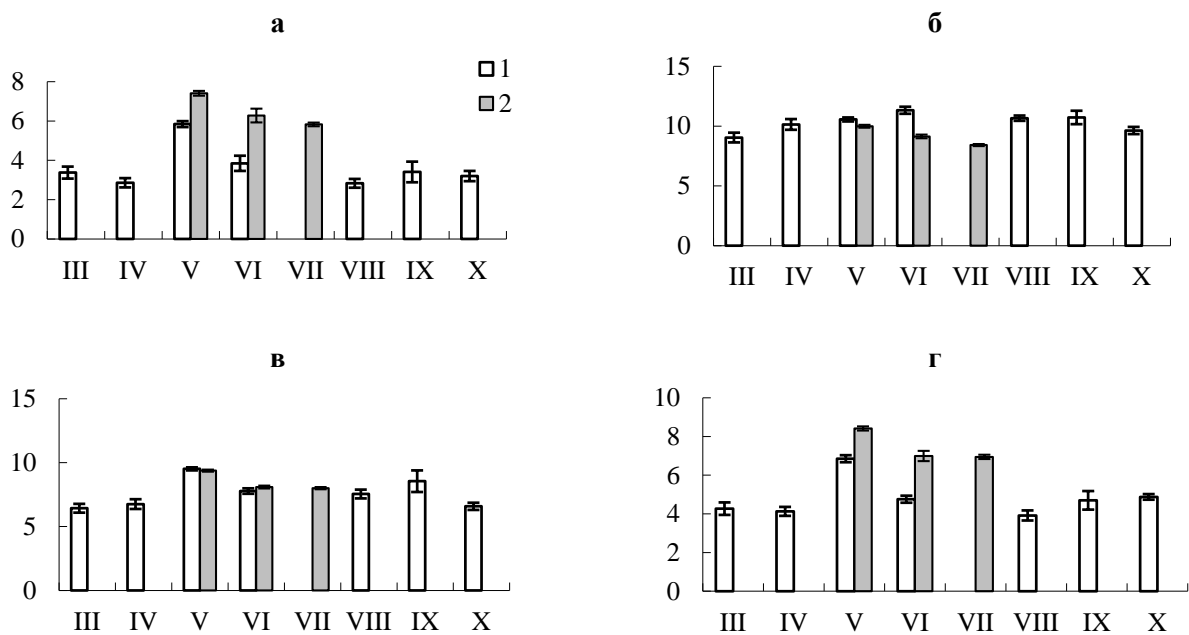


Рис. 4. Сезонные изменения активности АХЭ в различных отделах головного мозга леща: а — переднем; б — среднем и промежуточном; в — мозжечке; г — продолговатом. По оси ординат — активность АХЭ, мкмоль/г/мин; по оси абсцисс — месяцы. 1 — 2008, 2 — 2009 год.

Активность АХЭ (рис. 4г) достоверно возрастала, начиная с марта, и достигала наивысших годовых значений в мае. В летние месяцы уровень активности оставался постоянным и достаточно высоким, к осени достоверно снижался. Сезонная динамика содержания белка имела сходный с активностью фермента характер, но его более высокий, чем весной, уровень оставался и в осенний период (рис. 5г). При этом значения обоих показателей в 2008 г. были немного ниже, чем в 2009 г.

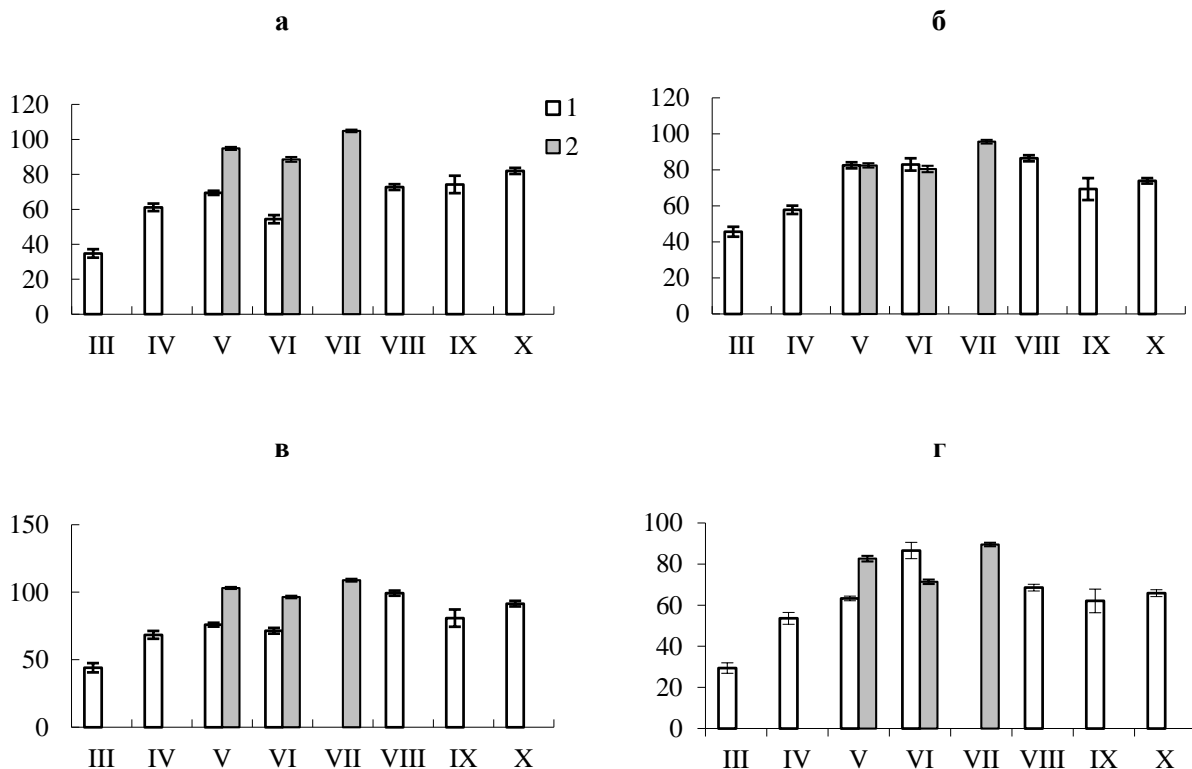


Рис. 5. Сезонные изменения содержания белка в различных отделах головного мозга леща: а — переднем; б — среднем и промежуточном; в — мозжечке; г — продолговатом. По оси ординат — содержание белка, мг/г; по оси абсцисс — месяцы. 1 — 2008, 2 — 2009 год.

В целом межсезонные различия обоих показателей более четко выражены в переднем и продолговатом мозге, чем в среднем мозге и мозжечке. Наибольших различий активность АХЭ и содержание белка соответственно достигают: в переднем мозге — 2 и 2.2 раза; в среднем и промежуточном мозге — 1,2 и 1.85 раза; в мозжечке — 1,5 и 2.1 раза; в продолговатом мозге — 1,7 и 2.9 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленные в мозге леща различия в активности АХЭ и содержание белка между месяцами носят четко выраженный сезонный характер. Исходя из вариабельности по полу, размеру и массе выборков леща, исследованных в разные месяцы в течение года, можно предположить, что это влияет на величину обоих биохимических показателей. Однако ранее было показано, что в объединенных среднем и промежуточном мозге другого вида рыб из Рыбинского водохранилища, окуня *P. fluviatilis* L., активность АХЭ не имеет половых различий, а диапазон её варьирования в зависимости от размерно-массовых характеристик рыб значительно меньше того, что наблюдается между сезонами (Чуйко, Козловская, 1989).

Сезонные изменения активности любого биологического показателя могут быть обусловлены либо влиянием факторов окружающей среды (экзогенные), либо эндогенными ритмами (феномен «биологических часов»), а чаще всего независимым совокупным влиянием обоих факторов (Шульман, 1972; Love, 1970). Одним из наиболее существенных факторов, оказывающих значительное влияние на интенсивность обменных процессов у пойкилотермных животных, является температура. Известно, что активность АХЭ мозга некоторых видов рыб прямо пропорционально зависит от температуры среды их обитания (Baslow, Nigrelli, 1964).

Ранее было показано, что в сезоны, характеризующиеся высокой температурой воды, уровень активности АХЭ мозга рыб достоверно выше, чем в периоды года с низкой температурой как в северном (Чуйко, Козловская, 1989; Chuiko et al., 1997; Nunes et al., 2015), так и в южном полушариях (Menéndez-Helman et al., 2015). Влияние температуры воды на величину активности АХЭ подтверждается и экспериментально. При акклимации окуня к разным температурам активность фермента выше у рыб, находящихся при более высокой температуре (Чуйко, Козловская, 1989).

У леща во всех отделах, за исключением объединенных среднего и промежуточного мозга, активность АХЭ была максимальной в мае. В среднем в этих двух отделах она также высокая в мае, но в июне еще выше. Однако при этом активность фермента варьировала в течение года в меньшей степени, чем в других отделах. В тоже время наиболее высоких годовых значений температура воды в Рыбинском водохранилище достигает в июле. Вместе с тем, также как и у леща, несовпадение максимумов активности фермента и температуры воды в водохранилище отмечено ранее для окуня *P. fluviatilis* (Чуйко, Козловская, 1989) и плотвы *R. rutilus* (Chuiko et al., 1997). Эти данные предполагают существование эндогенных причин сезонных изменений активности АХЭ мозга рыб. Пик активности фермента всех трех видов рыб по срокам соответствует преднерестово-нерестовому периоду.

Ранее изменения активности АХЭ мозга рыб, за исключением окуня и плотвы, в нерестовый период не отмечались. Вероятно, это обусловлено тем, что исследования проводились на теплолюбивых видах *Roccus americanus*, *Lepomis gibbosus*, (Edwards, 1971a, b), *L. macrochirus* (Hogan, 1970), *Fundulus heteroclitus* (Baslow, Nigrelli, 1964) с порционным нерестом, продолжающимся в течение всего лета и совпадающим по времени с периодом максимальных сезонных температур (Шатуновский, 1980). Увеличение активности АХЭ мозга, вызванное физиологическим состоянием рыб и повышением температуры воды, происходит у этих видов одновременно, что, вероятно, и не позволяло выявить влияние нереста.

Как известно, нерест является экстремально стрессирующим периодом в жизни рыб и связан с активизацией всех нейрогуморальных систем организма. В преднерестово-нерестовом состоянии все биохимические, физиологические и поведенческие ресурсы организма мобилизуются на подготовку и эффективное осуществление процесса воспроизводства: усиливаются обменные процессы, резко активизируется деятельность желез внутренней секреции, значительно увеличивается расход энергетических соединений, происходит созревание половых продуктов, активизируется питание, возрастает двигательная активность рыб (Шульман, 1972; Love, 1970; Шатуновский, 1980).

Контроль и регуляция изменений, происходящих в этот период в организме рыб, осуществляется нейрогуморальной системой. Прежде всего, усиливается активность практически всей гормональной системы (Поленов 1968). Показано, что перед нерестом у рыб возрастает в крови количество гормонов гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (Гарлов, Поленов 1996), пролактина (Singh, Singh 1981), катехоламинов (Пустовойтова-Восилене 1972), кортикостероидов (Цепеллован, Русаков 1976), включая кортизол (Pickering, Christie, 1981). Деятельность всех отделов мозга также усиливается, что, очевидно, и обуславливает повышение активности АХЭ. Имеются данные, свиде-

тельствующие об увеличении активности фермента в различных отделах мозга животных, в том числе и рыб, при стрессе (Pavlov et al., 1994; Чуйко и др., 2011), в связи с усилением их двигательной активности (Pavan et al., 1979) и условно-рефлекторной деятельностью (Чернышевская, 1983). Совокупность этих факторов и может быть причиной возрастания активности АХЭ в мозге рыб, наблюдаемая в период нереста. О прямом влиянии репродуктивных процессов на активность АХЭ рыб свидетельствует ее повышение в мозге мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambicus*) при экспериментально индуцированном нересте (Pavlov, 1994b).

Молекулярные механизмы повышения активности АХЭ мозга рыб до конца не ясны. Однако показано, что в мозге у крыс она возрастает на 50–60% после введения адреналина, а предварительное инъецирование пуромидина, ингибитора синтеза белка, снимает данный эффект. Эти результаты позволяют предположить, что активность АХЭ регулируется на уровне трансляции молекулы белка (Алексидзе, Балавадзе, 1976). У высших многоклеточных организмов регулирование активности ферментов путем индукции и репрессии их синтеза под влиянием гормонов имеет широкое распространение. Очевидно, что такой механизм существует и у рыб. Поэтому, с высокой вероятностью можно предположить, что увеличение активности АХЭ, наблюдаемое у рыб в преднерестово-нерестовый период, вызвано прямым действием гормонов и связано с увеличением интенсивности синтеза ферментного белка *de novo*. Об этом свидетельствуют сезонная динамика содержания водорастворимой фракции белка в мозге леща, характер которой полностью соответствует изменениям активности фермента. Ранее высокая степень корреляции сезонных изменений обоих показателей была обнаружена у плотвы (*R. rutilus*) Рыбинского водохранилища (Chuiko et al., 1997).

Как показало проведенное исследование, направленность сезонной динамики активности АХЭ и содержания белка не имеют существенных различий между отделами мозга леща. Из этого можно заключить, что такой тип сезонной цикличности исследуемых биохимических параметров является общим для холинергической системы всего мозга и, скорее всего, отражает общий характер направленности изменений интенсивности метаболизма в ЦНС рыб.

ВЫВОДЫ

1. Отделы мозга леща отличаются по своей удельной массе: наивысшую долю в общей массе мозга имеют объединенные средний и промежуточный, наименьшую — передний мозг. Максимальные различия составляют 5 раз.
2. Независимо от сезона и года отделы мозга леща отличаются по удельной активности АХЭ и содержанию белка. Минимальные значения обоих показателей наблюдаются в переднем мозге. Максимальные значения активности АХЭ выявлены в среднем и промежуточном отделах, а в остальных они ниже. Содержание белка во всех остальных отделах находится примерно на одинаковом уровне.
3. Активность АХЭ и содержание белка во всех отделах мозга леща демонстрируют одинаковую сезонную динамику. В целом наибольшие значения обоих показателей отмечены для периода с мая по июнь, хотя для каждого отдела имеются свои особенности. В основе сезонных изменений активности АХЭ и содержания белка в мозге леща лежат как эндогенные причины, так и температурный фактор окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексидзе Н.Г., Балавадзе М.В. Об участии системы адреналин–аденилатциклаза–3'5'–АМФ в индуктивном синтезе холинэстеразы в головном мозге // Сообщ. АН ГССР. 1976. Т. 81. № 1. С. 189–191. Aleksidze N.G., Balavadze M.V. Ob uchastii sistemy adrenalina–adenilattsiklaza–3'5'–AMF v induktivnom sinteze kholinesterazy v golovnom mozge // Soobscheniya AN GSSR. 1976. T. 81. № 1. S. 189–191. [Aleksidze N.G., Balavadze M.V. On the participation of adrenaline–adenylyl cyclase–3'5'–AMP in the inductive synthesis of cholinesterase in the brain. Reports of AN GSSR. 1976. Vol. 81. No. 1. P. 189–191.] In Russian.
- Гарлов П.Е., Поленов А.Л. Функциональная цитоморфология преоптикогипофизарной нейросекреторной системы рыб // Цитология. 1996. Т. 38. С. 275–299. Garlov P.A., Polenov A.L. Funktsional'naya tsitomorfologiya preoptikogipofizarnoi neurosekretornoj sistemy ryb // Tsitologiya. 1996. T. 38. S. 275–299. [Garlov P.A., Polenov A.L. Functional cytology preoptiko-pituitary neurosecretory system of fish // Cytology. 1996. Vol. 38. P. 275–299.] In Russian.
- Гдовский П.А., Ружинская Н.Н. Оценка функционального развития обонятельной и зрительной систем рыб по активности ацетилхолинэстеразы // Вопр. ихтиол. 1990. Т. 30. № 2. С. 305–314. Gdovskii P.A., Ruzhinskaya N.N. Otsenka funktsional'nogo razvitiya obonytel'noi i zritel'noi sistem ryb po aktivnosti atsetilckholinesterasy // Voprosy ikhtologii. 1990. T. 30. № 2. S. 305–314. [Gdovskii P.A., Ruzhinskaya N.N. Evaluation of the functional development of the olfactory and optic systems fish using acetylcholinesterase activity // J. Ichthyology. 1990. Vol. 30. No. 2. P. 305–314.] In Russian.
- Голованов В.К., Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Головкина Е.И., Некрутов Н.С. Динамика активности ацетилхо-

- линэстеразы и водорастворимых белков в головном мозге рыб при разных скоростях нагрева в летний сезон года // Тр. Карел. НЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2015. № 12. С. 116–123. [Golovanov V.K., Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Golovkina E.I., Nekrutov N.S. Dynamics of acetylcholinesterase activity and water-soluble proteins in the brain fish at different speeds of heating in the summer season of the year // Proceedings Karel. SC RAS. Ser. Experimental. Biology. 2015. No. 12. P. 116–123. DOI: 10.17076/eb255]. In Russian.
- Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Мандрико Е.В., Крупнова Е.П. О некоторых механизмах двунаправленной регуляции сердечного ритма у костистых рыб // Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. 1990. Т. 76. № 10. С. 1470–1473. Kopylova G.N., Samonina G.E., Mandriko E.V. O nekotorykh mekhanizmaxh dvunapravlennoy regulyatsii serdechnogo ritma u kostistyykh ryb // Fiziologicheskii zhurnal SSSR im. I.M. Mechnikova. 1990. T. 76. № 10. S. 1470–1473. [Kopylova G.N., Samonina G.E., Mandriko E.V. Some mechanisms of bi-directional regulation of heart rate in teleosts // Sechenov Physiological Journal of the USSR. 1990. Vol. 76. No. 10. P. 1470–1473.] In Russian.
- Лейбсон Н.Л. Ацетилхолинэстераза мозга в филогенезе позвоночных // ДАН СССР. 1963. Т. 153. № 6. С. 1435–1438. Leibson N.L. Atsetsilkholinesterasa mozga v filogeneze pozvonochnykh // Doklady Akademii Nauk SSSR. 1963. T. 153. № 6. S. 1435–1438. [Leibson N.L. Brain acetylcholinesterase in the phylogeny of vertebrates // Reports of Academy of Sciences of USSR. 1963. Vol.153. No. 6. P. 1435–1438.] In Russian.
- Лукьянова О.Н. Молекулярные биомаркеры. Владивосток: изд-во ДВГАЭУ, 2001. 196 с. Lukyanova O.N. Molekulyarnye biomarkery. Vladivostok: izdatel'stvo DVGAEU, 2001. 196 s. [Lukyanova O.N. Molecular biomarkers / Vladivostok: Far East State Academy of Economy and Management. 2001. 196 p.] In Russian.
- Поленов А.Л. Гипоталамическая нейросекреция / Л.: Наука, 1968. 250 с. Polenov A.L. Gipotalamicheskaya neirosecretsiya / Leningrad: Nauka, 1968. 250 s. [Polenov A.L. Hypothalamic neurosecretion / Leningrad: Science, 1968. 250 p.] In Russian.
- Пустовойтова-Восилене М.Е. Сезонные колебания содержания катехоламинов и ДОФА в тканях карпа // Ж. эвол. биохим. физиол. 1972. Т. 8. С. 94–95. Pustovoitova-Vosilene M.E. Sezonnnye kolebaniya sodержaniya katekholaminov i DOFA v tkanaykh karpa // Zhurnal evlutsionnoi biokhimii i fiziologii. 1972. T. 8. S. 94–95. [Pustovoitova-Vosilene M.E. Seasonal fluctuations of catecholamines and DOPA in the tissues of the carp // J. Evol. Biochem. Physiol. 1972. Vol. 8. P. 94–95.] In Russian.
- Ружинская Н.Н., Гдовский П.А. Особенности локализации и возможная роль ацетилхолинэстеразы в обонятельной луковице рыб // Сенсор. системы. 1992. Т. 6. № 3. С. 26–29. Ruzhinskaya N.N., Gdovskii P.A. Osobennosti lokalizatsii i vozmozhnaya rol' atsetilkholinesterazy v obonyatel'noi lukovitse ryb // Sensornye sistemy. 1992. T. 6. № 3. S. 26–29. [Ruzhinskaya N.N., Gdovskii P.A. Features of the location and the possible role of acetylcholinesterase in the olfactory bulb of fish // Sensory Systems. 1992. Vol.6. No. 3. P.26–29.] In Russian.
- Ружинская Н.Н., Гдовский П.А., Мензикова О.В. Влияние anosmia и деэферентации на активность ацетилхолинэстеразы обонятельной луковицы карася // В кн. Флеров Б.А. (ред). Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Тр. ИБВВ РАН, 57(60), Л.: Наука, 1990. С. 79–84. Ruzhinskaya N.N., Gdovskii P.A., Menzikova O.V. Vliyanie anosmia i defferentatsii na aktivnost' atsetilkholinesterazy obonyatel'noi lukovitse karasya // V kn. Flerov B.A. (red.) Fiziologiya, biokhimiya i toksikologiya presnovodnykh zhivotnykh. Trudy IBVV RAN, 57 (60), L.: Nauka, 1990. S. 79–84. [Ruzhinskaya N.N., Gdovskii P.A., Menzikova O.V. The impact of anosmia and defferentation on acetylcholinesterase activity in olfactory bulb of goldfish // In: Flerov B.A. (ed.) Physiology, biochemistry and toxicology of freshwater animals. Proceed. IBIW RAS, 57 (60). L.: Science, 1990. P. 79–84.] In Russian.
- Хайдарлиу С.Х., Крепис О.И., Тонкоглас В.П., Духовная Н.П. Распределение и суточные ритмы активности холинэстераз в различных отделах ЦНС и внутренних органах толстолобика / Рук. деп. в ВИНТИ. 1984. N5798–84 Деп. 13 с. Khaidaraliu S.V., Krepis O.I., Tonkoglas V.P., Dukhovnaya N.P. Raspredelenie i sutochnye ritmy aktivnosti kholinesteraz v razlichnykh otdelakh TsNS i vnutrennikh organakh tolstolobika / Ruk. dep. v VINITI. 1984. N5798–84 Dep. 13 s. [Khaidaraliu S.V., Krepis O.I., Tonkoglas V.P., Dukhovnaya N.P. Distribution and circadian rhythms of cholinesterase activity in different parts of the CNS and internal organs of silver carp / Manuscr. dep. in the Institute for Scientific and Technical Information (VINITI RAS) 1984. N5798–84 Dep. 13 p.] In Russian.
- Хайдарлиу С.Х., Крепис О.И., Тонкоглас В.П., Духовная Н.П. Циркадные вариации функционального состояния основных отделов ЦНС белого толстолобика // VI Всес. конф. по экологич. физиол. и биохим. рыб. Тез. докл. Вильнюс, 1985. С. 256–257. Khaidaraliu S.V., Krepis O.I., Tonkoglas V.P., Dukhovnaya N.P. Tsirkadnye variatsii funktsional'nogo sostoyaniya osnovnykh otdelov TsNS belogo tolstolobika // VI Vsesoyuz. konf. po ekolog. fiziol. i biokh. Tezisy dokl. Vil'nyus, 1985. S. 256–257. [Khaidaraliu S.V., Krepis O.I., Tonkoglas V.P., Dukhovnaya N.P. Circadian variation of the functional state of the main divisions of CNS in silver carp // VI All-Union Conf. Ecol. Physiol. Biochem. Proceed. Book. Vilnius, 1985. P. 256–257.] In Russian.
- Хайдарлиу С.Х., Крепис О.И., Тонкоглас В.П., Духовная Н.П. Влияние стрессовых факторов на активность холинэстераз в отделах ЦНС и внутренних органах толстолобиков // Первый Симп. экол. биохим. рыб. Тез. докл. Ярославль, 1987. С. 197–198. Khaidaraliu S.V., Krepis O.I., Tonkoglas V.P., Dukhovnaya N.P. Vliyanie stressovykh faktorov na aktivnost' tolstolobikov // Pervyi simpozium po ekologicheskoy biokhimii ryb. Tezisy dokladov. Yaroslavl, 1987. S. 197–198. [The impact of stress factors on the cholinesterase activity in the parts of the CNS and internal organs of silver carp // First Symp. on Ecolog. Biochem. Yaroslavl, 1987. P. 197–198.] In Russian.
- Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука, 1981. 136 с. Khlebovich V.V. Akklimatsiya vodnykh organizmov. L.: Nauka, 1981. 136 s. [Khlebovich V.V. Acclimation of aquatic organisms. L.: Science, 1981. 136 p.] In Russian.

- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир, 1977. 398с. [Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia–London–Toronto: W.B. Saunders Company, 1973, 358 p. In English.] In Russian.
- Цепеллован П.Г., Русаков Ю.И. Содержание кортикостероидов в крови у русского осетра *Acipenser guldenstadtii* на различных этапах жизненного цикла // Ж. эвол. биохим. физиол. 1976. Т. 12. С. 77–79. [Tsepellovan P.G., Rusakov Yu.I. Soderzhanie kortikosteroidov v krovi russkogo osetra *Acipenser guldenstadtii* na razlichnykh etapakh zhiznennogo tsikla // Zh. Evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii. 1976. T. 12. S. 77–79. [Tsepellovan P.G., Rusakov Yu.I. The content of corticosteroids in the blood of Russian sturgeon *Acipenser guldenstaedtii* at various stages of the life cycle // J. Evol. Biochem. Physiol. 1976. Vol. 12. P. 77–79.] In Russian.
- Чернышевская И.А. Гистохимия холинэстераз коры головного мозга. М.: Наука, 1983. 104 с. Chernyshevskaya I.A. Gistokhimiya kholinesteraz kory golovnogo mozga. M.: Nauka, 1983. 104 s. [Chernyshevskaya I.A. Histochemistry of cholinesterases of brain cortex. M.: Science, 1983. 104 p.] In Russian.
- Чуйко Г.М. Гл. XV. Биомаркеры в гидроэкотоксикологии: принципы, методы и методология, практика использования / Д.Б. Гелашвили, Г.В. Шурганова (ред.). Экологический мониторинг. Часть VIII. Современные проблемы мониторинга пресноводных экосистем: Учебное пособие. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского госуниверситета, 2014. С. 351–372. Chuiko G.M. Gl. XV. Biomarkery v gidroekotoksikologii: printsipy, metody i metodologiya, praktika ispolzovaniya / D.B. Gelashvilli, G.V. Shurganova (red.) Ekologicheskii monitoring. Chast' VIII. Sovremennye problemy monitoring presnovodnykh ekosistem. Nizhnii Novgorod: Izdatel'stvo Nizhegorodskogo gosuniversiteta, 2014. S. 351–372. [Chuiko G.M. Ch. XV. Biomarkers in hydro ecotoxicology: principles, methods and methodology, practice of use / D.B. Gelashvilli, G.V. Shurganova (eds.). Ecological monitoring. Part VIII. Modern problems of the monitoring of freshwater ecosystems: Tutorial. Nizhny Novgorod: Publishing House of the Nizhny Novgorod State University, 2014. P. 351–372.] In Russian.
- Чуйко Г.М., Козловская В.И. Сезонные изменения активности ацетилхолинэстеразы мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) / Г.Е. Сабуров (ред.) Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: ЯрГУ, 1989. С. 27–38. Chuiko G.M., Kozlovskaya V.I. Sezonnye izmeneniya aktivnosti atsetilkholinesterazy mozga okunya (*Perca fluviatilis* L.) / G.E. Saburov (red.) Fiziologiya i toksikologiya gidrobiontov. Yaroslavl: YarGU, 1989. S. 27–38. [Chuiko G.M., Kozlovskaya V.I. Seasonal fluctuations of acetylcholinesterase activity in brain of perch (*Perca fluviatilis* L.) / G.E. Saburov (ed.). Physiology and toxicology of hydrobionts. Yaroslavl: YarSU, 1989. P. 27–38.] In Russian.
- Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Микряков Д.В., Микряков В.Р. Влияние кортикостероида дексаметазона и хендлинга на активность ацетилхолинэстеразы и содержание водорастворимого белка в мозге и печени стерляди *Acipenser ruthenus* Linneaus // Рыболовство и рыбное хозяйство. 2011. № 7. С. 39–43. Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Mikryakov D.V., Mikryakov V.R. Vliyanie kortikosteroida deksametazona i khendlinga na aktivnost' atsetylkholinesterazy i sodержanie vodorastvorimogo belka v mozge i pecheni sterlyadi *Acipenser ruthenus* Linneaus // Rybolovstvo i rybnoe khozyaistvo. 2011. № 7. S. 39–43. [Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Mikryakov D.V., Mikryakov V.R. Influence of corticosteroid dexamethasone and handling on acetylcholinesterase activity and water-soluble protein content in the brain and liver of sterlet *Acipenser ruthenus* Linneaus // Fishing and Fisheries. 2011. No. 7. P. 39–43.] In Russian.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 288 с. Shatunovskii M.I. Ekologicheskije zakonomernosti obmena veschestv morskikh ryb. M.: Nauka, 1980. 288 s. [Shatunovskii M.I. Environmental regularities of marine fish metabolism. M.: Science, 1980. 288 p.] In Russian.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая промышленность, 1972. 367 с. Shul'man G.E. Fiziologo-biokhimicheskie osobennosti godovykh tsiklov ryb. M.: Pischevaya promyshlennost', 1972. 367 s. [Shul'man G.E. Physiological and biochemical characteristics of the annual cycle of fish. M.: Food Industry, 1972. 367 p.] In Russian.
- Baslow M.H., Nigrelli R.F. The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus* // Zoologica. 1964. Vol. 49. No. 1. P. 41–51.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
- Chuiko G.M., Zhelnin Y., Pod'gornaya V.A. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): a freshwater fish from Northwest Russia// Comp. Biochem. Physiol. 1997. Vol. 117C. No. 3. P. 251–257.
- Chuiko G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide // Comp. Biochem. Physiol. 2000. Part C. Vol. 127. P. 233–242.
- Crawshaw L.I., Wollmuth L.P. Effective loci and roles of acetylcholine in temperature regulation of goldfish // Amer. J. Physiol. (Reg. Integr. Comp. Physiol.). 1992. Vol. 263. No. 32. P. 596–601.
- Edwards Q.D. Normal brain cholinesterase activity in the white perch / Edgewood Arsenal technical report. EATR 4524. Maryland, 1971a. 27 p.
- Edwards Q.D. Normal brain cholinesterase activity in the pumkinseed sunfish / Edgewood Arsenal technical report. EATR 4538. Maryland, 1971b. 21 p.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone, I., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. Vol. 70. P. 88–95.

- Ekstrom P. Distribution of cholineacetyltransferase-immunoreactive neurons in the brain of a cyprinidae teleost (*Phoxinus phoxinus* L.) // J. Comp. Neurol. 1987. Vol. 256. P. 494–515.
- Ekstrom P, Korf H-W. Putative cholinergic elements in the photosensory pineal organ and retina of a teleost, *Phoxinus phoxinus* L. (Cyprinidae) // Cell Tissue Res. 1986. Vol. 246. P. 321–329.
- Francis A., Schechter N. Regional and subcellular distribution of cholinergic enzymes and receptor activity in goldfish brain // Neuroscince. 1980. Vol. 5. P. 293–301.
- Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. NY: Oxford University Press, 2002. 466 p.
- Hogan, J.W. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1970. Vol. 5. P. 347–353.
- Kirby M.F., Morris S., Hurst M., Kirby S.J., Neall P., Tylor T., Fagg A. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries // Marine Pollut. Bull. 2000. Vol. 40. No. 9. P. 780–791.
- Kozlovskaya V.I., Mayer F.L., Menzikova O.V., Chuyko G.M. Cholinesterases of aquatic animals // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1993. Vol. 132. P. 117–142.
- Love R. M. The chemical biology of fishes: with a key to the chemical literature. London: Academ. Press, 1970. 547 p.
- Menéndez-Helman R.J., Ferreyroa G.V., Afonso M.S., Salibián A. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus* // Ecotox. Environ. Safety. 2015. Vol. 111. P. 236–241.
- Moralev S.N., Rozengart E.V. Comparative enzymology of cholinesterases / La Jolla (US, CA): International University Line, 2006. 484 p.
- Nunes B.S., Travasso R., Gonçalves F., Castro B.B. Biochemical and physiological modifications in tissues of *Sardina pilchardus*: spatial and temporal patterns as a baseline for biomonitoring studies // Front. Environ. Sci. Environ. Toxicol. February 2015. Vol. 3. Art. 7. 14 p. DOI: 10.3389/fenvs.2015.00007.
- Pavlov D.F. A simple pharmacological analysis of the cholinergic control of respiration in perch *Perca fluviatilis* L. exposed to DDVP, an organophosphorus insecticide // Comp. Biochem. Physiol. 1994a. Vol. 108C. No. 1. P. 107–111.
- Pavlov D.F. Brain acetylcholinesterase activity in relation to induced reproductive activity in Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* Peters // Comp. Biochem. Physiol. 1994b. Vol. 109A. No. 2. P. 231–233.
- Pavlov D.F., Chuiko G.M., Gerassimov Y.V., Tonkopyi V.D. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream *Abramis brama* L. as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide // Comp. Biochem. Physiol. 1992. Vol. 103C. No. 3. P. 563–568.
- Pavlov D.F., Chuiko G.M., Shabrova A.G. Adrenaline induced changes of acetylcholinesterase activity in the brain of perch (*Perca fluviatilis* L.). Comp. Biochem. Physiol. 1994. Vol. 108C. No. 1. P. 113–115.
- Pickering A.D., Christie P. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. // Gen. Comp. Endocrinol. 1981. Vol. 44. P. 487–496.
- Singh S.P., Singh T.P. Prolactin level in relation to gonadotropin concentration during different phases of annual reproductive cycle in freshwater catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) // Ann. Endocrinol. 1981. Vol. 43. P. 159–168.
- Taylor P. The cholinesterases // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. No. 7. P. 4025–4028.
- Triebkorn R., Böhmer J., Braunbeck T., Honnen W., Köhler H.-R., Lehmann R., Oberemm A., Schwaiger J., Segner H., Schüürmann G., Traunspurger W. The project VALIMAR (VALIdation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment // J. Aquat. Ecosys. Stress Recov. 2001. Vol. 8. P. 161–178.
- Wijeyaratne W. M. D. N., Pathiratne A. Acetylcholinesterase inhibition and gill lesions in *Rasbora caverii*, an indigenous fish inhabiting rice field associated waterbodies in Sri Lanka // Ecotoxicology. 2006. Vol. 15. P. 609–619.

SEASONAL DYNAMICS OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AND PROTEIN CONTENT IN VARIOUS PARTS OF BRAIN IN FRESHWATER BONY FISH *ABRAMIS BRAMA* L. FROM THE RYBINSK RESERVOIR

G. M. Chuiko, E. I. Golovkina, V. A. Podgornaya

I.D. Papanin Institute of the Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: gko@ibiw.yaroslavl.ru

The relative weight and seasonal dynamics of the activity of acetylcholinesterase (AChE) and the protein content of various parts of the brain in a typical representative of the middle latitudes ichthyofauna, bony fish bream (*Abramis brama* L), were studied. It was found that the parts of the brain are different for all the investigated parameters. The lowest relative weight and values of both biochemical parameters have been noted in the forebrain, the highest — in the joint samples of midbrain and interbrain. At that, the protein content of the remaining parts of brain is the same, as in a midbrain and diencephalon. AChE activity and protein content in all parts of the brain demonstrate seasonal cyclical dynamics. In general, the highest values of both indicators marked the period from May to June, although each department has its own peculiarities.

Key words: acetylcholinesterase activity, protein, parts of the brain, seasonal dynamics, bream (*Abramis brama* L), Rybinsk reservoir.

СУБСТРАТНО-ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРЕСНОВОДНОЙ ПИЯВКИ *CASPIOBDELLA FADEJEWI* (Epstein) (PISCICOLLIDAE)

Л.Н. Лапкина, Г.М. Чуйко, В.А. Подгорная

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

152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: lapkina@ibiw.yaroslavl.ru

Исследованы основные биохимические свойства и кинетические характеристики холинэстеразы (ХЭ) представителя класса пиявок, *Caspiobdella fadejewi* (Epstein) (отр. Rhynchobdellea, сем. Piscicolidae). Установлено, что значения кинетических характеристик фермента пиявки с разными субстратами, за исключением ПрТХ и МеТХ, достоверно различаются. Соотношение скоростей гидролиза для АТХ : ПрТХ : БуТХ : МеТХ составляет 100:74:13:59, величины V варьируют в пределах от 3.8 до 0.48 мкмоль/г/мин с АТХ и БуТХ соответственно. Эффект субстратного торможения отсутствует со всем субстратами. Наибольшим сродством ХЭ пиявки обладает к АТХ ($K_m = 2.64 \times 10^{-4}$ М), а минимальным — к БуТХ ($K_m = 22.2 \times 10^{-4}$ М), что подтверждают значения показателя V/K_m . Фосфорорганические ингибиторы ДДВФ и параоксон с одинаковой скоростью тормозят гидролиз трех субстратов (величины k_{II} , как и значения pI_{50} одинаковые). Проведенный субстратно-ингибиторный анализ, показывает, что у данного вида пиявок присутствует одна ХЭ, отличающийся по свойствам со свойствами как типичных АХЭ и БуХЭ позвоночных, так и других изученных ранее аннелид.

Ключевые слова: холинэстеразы, пиявки, активность, субстратная специфичность, ингибиторы.

ВВЕДЕНИЕ

Холинэстеразы (ХЭ) — ферменты, широко распространенные в живой природе от микроорганизмов и простейших одноклеточных организмов до позвоночных, включая человека. Выделяют два основных типа ХЭ: ацетилхолинэстераза (АХЭ; ацетилхолин ацетилгидролаза, К.Ф. 3.1.1.7) и холинэстераза (ацилхолин ацилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.8), представленная рядом ферментов. К последнему типу относится наиболее известная и часто встречаемая среди животных бутирилхолинэстераза (БуХЭ). Оба типа эволюционно связаны, но кодируются разными генами и имеют свои специфические черты, на основании которых их различают. АХЭ специализированный фермент и его основная физиологическая функция — гидролиз ацетилхолина (АХ), медиатора передачи нервного импульса. БХЭ менее специфична в отношении субстратов и ее роль окончательно не ясна, хотя заметная активность фермента в крови и печени высших позвоночных указывает на его высокую функциональную значимость. Типичными считаются АХЭ мозга и эритроцитов человека, лошади, быка и обезьяны и БХЭ сыворотки лошади. При изучении ХЭ других животных их сравнивают по свойствам и классифицируют относительно одного из типов ХЭ (Бресткин и др., 1997; Moralev, Rozengart, 2006).

В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о наличии у филогенетически разных групп животных ХЭ, отличающихся по свойствам от типичных. “Нетипичные” ХЭ обнаружены как у позвоночных (голубь *Columbia livia*, курица *Gallus gallus*), так и у беспозвоночных (бабочек (*Lepidoptera*), клопов (*Hemiptera*), тлей (*Aphidinea*, *Homoptera*), комнатной мухи (*Musca domestica*), медоносной пчелы (*Apis mellifera*), тихоокеанского кальмара (*Todarodes pacificus*), прудовика (*Limnea stagnalis*), мурекса (*Murex trunculus*)) (Бресткин и др., 1997), пресноводной олигохеты (*Lumbriculus variegatus*) (Chuiko et al., 2011).

Пиявки относятся к кольчатым червям (аннелиды) и являются высшим беспозвоночным. От них ведется генеалогия членистоногих и моллюсков. Пределы варибельности свойств ХЭ аннелид, судя по литературным данным, весьма широки. Это очевидно, несмотря на то, что исследованы единичные объекты из каждого класса: полихет (Брик, 1973), олигохет (Augustinsson, 1949; Andersen et al., 1978; Principato et al., 1989; Talesa et al., 1995; Caselli et al., 2006; Chuiko et al., 2011) и пиявок (Лапкина, Стойкова, 1986; Лапкина и др., 2005; 2007; Лапкина, Чуйко, 2007).

Цель работы — исследовать основные биохимические свойства и кинетические характеристики ХЭ одного из представителей класса пиявок, *Caspiobdella fadejewi* (Epstein), и сравнить их со свойствами типичных АХЭ и БуХЭ позвоночных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на пресноводной эктопаразитической пиявке *Caspiobdella fadejewi* (Epstein) (сем. *Piscicolidae*, отр. *Rhynchobdellida*). Червей собирали на карповых рыбах — плотве (*Rutilus rutilus* L.), язе (*Leuciscus idus* L.) и карасе (*Carassius carassius* L.), выловленных в мае–сентябре 2004–2005 гг. в Волжском плесе (58°03'52"с.ш., 38°18'02"в.д.) Рыбинского водохранилища

(Ярославская обл.). Из-за малых размеров (длина 5–8 мм, толщина 1–2 мм) для биохимического анализа использовали целых червей. Предварительно было установлено, что в течение 7 дней кровь рыбы-хозяина полностью утилизируется пиявками и в их организме присутствует лишь собственная ХЭ. Чтобы исключить влияние на активность ХЭ пиявок соответствующих ферментов крови рыб, на которых они питались, червей до анализа выдерживали в течение не менее 10 дней в лабораторных условиях без кормления.

Для биохимического анализа навеску из 5–7 целых червей гомогенизировали, используя фарфоровые ступку и пестик для растирания с кварцевым песком в 0.1 М фосфатном буфере с pH 7.5. Гомогенаты центрифугировали при 5000 об/мин (2000 g) и $t=4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин на рефрижераторной центрифуге Hettich Micro 22 R (Germany). Для биохимического анализа брали супернатант.

Активность ХЭ определяли по методу (Ellman et al., 1961) с дитионитробензойной кислотой (ДТНБ) при температуре 30°C и времени инкубации 10–30 мин. В качестве субстратов использовали иодиды ацетил-, пропионил-, бутирил- и ацетил- β -метилтиохолина (АТХ, ПрТХ, БуТХ и МеТХ соответственно) в конечной концентрации 4.3×10^{-4} М (все реактивы фирмы Sigma, USA). Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 г ткани.

Кинетические характеристики — максимальную скорость гидролиза (V) и константу Михаэлиса (K_m), определяли в диапазоне концентраций субстратов 4.3×10^{-4} – 5.56×10^{-3} М по графикам Лайнувера-Берк (Диксон, Уэбб, 1982), а бимолекулярные константы скорости ингибирования (k_{II}) и значения отрицательного десятичного логарифма молярной концентрации ингибитора, снижающей активность фермента на 50% (pI_{50}) — как описано ранее (Chuiko, 2000). Использовали фосфорорганические ингибиторы (ФОИ): ДДФФ (0,0-диметил-0-(2,2-дихлорвинил) фосфат, 99%; CAS № 62–73–7 и параоксон (О, О-диэтил-О-(4-нитрофенил) фосфат, 98%, CAS № 311–45–5 (оба производства Chem Service, USA). Более подробно процедуры подготовки проб и проведения анализов описаны ранее (Chuiko, 2000; Чуйко и др., 2002; Chuiko et al., 2011).

Результаты представлены в виде средних и стандартных ошибок ($x \pm SE$), каждый эксперимент проведен в 6 повторностях. Для оценки достоверности использован однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, LSD-тест) при $p=0.05$ (Sokal, Rohlf, 1995). Расчет кинетических характеристик и статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statgraphics Plus 2.1 и Excel 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В предварительных экспериментах выявлено, что в день снятия пиявок с рыб и в последующие несколько суток способность гомогенатов червей гидролизовать различные холиновые субстраты зависит от вида рыбы-хозяина, с которой пиявки были сняты (Табл. 1).

Таблица 1. Абсолютные (A_1 , мкмоль/г/мин) и относительные (A_2 , %) скорости гидролиза разных тиохолиновых субстратов гомогенатами пиявок *C. fadjejewi* сразу после питания на разных видах рыб

Субстрат	Вид рыбы					
	плотва		язь		карась	
	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2
АТХ	16.0	100	0.67	100	0.41	100
ПрТХ	2.2	14	0.41	62	0.22	52
БуТХ	31.6	198	1.3	194	0.02	5
МеТХ	1.9	12	0.28	41	0.24	58

Особь, снятые с плотвы и язя, обладали высокой активностью ХЭ и были способны гидролизовать БуТХ с большей скоростью, чем АТХ. Активность ХЭ червей, питавшихся на карасе, заметно ниже и их гомогенаты практически не гидролизуют БуТХ. После снятия червей с рыб и по мере переваривания ими крови, гидролизующая способность их гомогенатов снижалась, достигая через некоторое время постоянного уровня и теряя при этом возможность гидролизовать БуТХ. Продолжительность этого периода зависела от размера червей, степени их насыщения, скорости утилизации пищи, интенсивности коконообразования и составляла 10–15 дней. Поэтому основные исследования свойств ХЭ пиявок проводились на голодных особях не раньше чем через 20 дней после их снятия с рыб.

Гомогенаты из голодных пиявок, независимо от того, с какого вида рыбы они были сняты, гидролизуют АТХ, ПрТХ, БуТХ и МеТХ в среднем со скоростью 2.23 ± 0.15 , 1.13 ± 0.07 , 0 и 1.28 ± 0.07 мкмоль/г/мин или в соотношении $100 : 50 : 0 : 58$ при концентрации субстрата 4.3×10^{-4} М (см. рисунок). При повышении концентрации субстрата активность ХЭ возрастает. При этом ни один из холиновых субстратов в исследованном диапазоне концентраций не оказывает тормозящего действия на ферментативную активность.

Значения кинетических характеристик ХЭ червей с разными субстратами, за исключением ПрТХ и МеТХ, достоверно различаются (Табл.2).

Таблица 2. Кинетические характеристики гидролиза тиохолиновых субстратов для ХЭ гомогенатов пиявок *S. fadejewi*.

Субстрат	V		K _m , 10 ⁻⁴ М	V / K _m , 10 ³ мин ⁻¹ г ⁻¹
	мкмоль/г/мин	%		
АТХ	3.81 ± 0.23^1	100	2.64 ± 0.18^1	14
ПрТХ	2.83 ± 0.18^2	74	5.68 ± 0.31^2	5
БуТХ	0.48 ± 0.03^3	13	22.21 ± 1.05^3	0.022
МеТХ	2.26 ± 0.12^2	59	6.80 ± 0.40^2	3.3

Примечание: представлены средние значения и стандартные ошибки ($x \pm SE$), N=6; величины в каждом столбце с одинаковыми надстрочными индексами между собой достоверно не различаются (ANOVA, LSD-тест, $p > 0.05$).

При этом величины V варьируют в пределах от 3.8 до 0.48 мкмоль/г/мин с АТХ и БуТХ, соответственно, а их соотношение для АТХ : ПрТХ : БуТХ : МеТХ составляет $100 : 74 : 13 : 59$. Наибольшим сродством ХЭ червей обладает к АТХ ($K_m = 2.64 \times 10^{-4}$ М), а минимальным — к БуТХ ($K_m = 22.2 \times 10^{-4}$ М). Это подтверждают и различия между субстратами по значениям показателя V/K_m .

Чувствительность ХЭ пиявки к исследованным ФОИ различается (Табл. 3).

Таблица 3. Значения величин k_{II} (М⁻¹ мин⁻¹) и pI_{50} для ХЭ пиявки *S. fadejewi* при взаимодействии с ДДВФ и параоксоном

Субстрат	ДДВФ		Параоксон	
	$k_{II} \times 10^6$	pI_{50}	$k_{II} \times 10^6$	pI_{50}
АТХ	$2.3 \pm 0.2^*$	7.6	0.53 ± 0.03	6.9
ПрТХ	2.3 ± 0.2	7.6	0.53 ± 0.03	6.9
МеТХ	4.0 ± 0.7	7.9	1.0 ± 0.06	7.2

* различия между значениями константы для разных ингибиторов с каждым субстратом достоверны.

ДДВФ со всеми субстратами оказывает достоверно в 4 раза более сильное ингибирующее действие, чем параоксон. Значения k_{II} с этими ингибиторами соответственно варьируют в диапазоне $2.3-4.0 \times 10^6$ и $0.53-1.0 \times 10^6$ М⁻¹ мин⁻¹. В тоже время каждый из ингибиторов тормозит гидролиз разных субстратов с близкой скоростью, т.е. значения k_{II} со всеми субстратами достоверно не различаются.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показывают результаты исследований субстратной специфичности ХЭ пиявок сразу после снятия червей с рыбы, она в значительной мере обусловлена видовыми особенностями спектра ХЭ крови хозяина. Кровь плотвы и язя обладает высокой активностью ХЭ и в ней присутствуют АХЭ и БуХЭ, причем последняя составляет от 83 до 95% общей активности ХЭ. Активность ХЭ крови карася заметно ниже, она не содержит БуХЭ и в ней обнаружена только АХЭ (Желнин и др., 1998; Чуйко, Подгорная, 2007). Поэтому гомогенаты червей, питавшихся на первых двух видах рыб, имели высокую общую активность ХЭ и хорошо гидролизывали БуТХ. В то же время, гомогенаты пиявок, снятых с карася обладали более низкой скоростью гидролиза субстратов и были не активны в отношении БуТХ. Все это свидетельствует о том, что способность гомогенатов некоторых особей пиявок гидролизовать БуТХ обусловлена не их собственным ферментом, а связана с присутствием БуХЭ в крови рыбы-хозяина, на которой они питались.

Кинетические свойства ХЭ-аз определяются конформационной структурой их активного центра (АЦ) и составляющих его аминокислотных остатков. Поэтому, проведение специфического субстратно-ингибиторного анализа наряду с исследованиями по направленному мутагенезу ферментного белка позволяет изучать структурно-молекулярные и функциональные особенности ХЭ-аз. По современным представлениям каталитическая единица ХЭ-аз представляет собой мономерный глобулярный белок, в середине которого расположен каталитический активный центр (АЦ). Он состоит из двух функционально важных и пространственно разделенных участков: эстеразного, осуществляющего гидролиз эфирной связи субстрата, и холин-связывающего, который ориентирует молекулы субстрата относительно АЦ. Эстеразный участок включает каталитическую триаду — остатки аминокислот серина, гистидина и глутамата, которые взаимодействуют с ацильной частью молекулы субстрата и фосфорорганических (ФОИ) и карбаматных ингибиторов, и оксианионную полость, включающую остатки двух цистеинов и одного аланина, атомы азота которых образуют водородные связи с карбонильным кислородом субстрата и фосфонильным кислородом ФОИ. Холин-связывающий пункт обязательно включает в себя остаток триптофана, с индольным кольцом которого взаимодействует аммониевая группировка холиновой части субстрата. Большая роль в формировании и функционировании АЦ принадлежит гидрофобным областям, расположенным вокруг него и часто являющимся главным фактором, который определяет различия в свойствах ХЭ разного происхождения и типа. Гидрофобная область, окружающая эстеразный участок и стерически определяющая допустимый размер ацильной группы субстрата и ацилирующих ингибиторов, называется «ацильным карманом». Конфигурация «ацильного кармана» у БуХЭ отличается от АХЭ тем, что позволяет связывать субстраты и ингибиторы с большей ацильной частью. У АХЭ присутствует еще и периферический «анионный» пункт (ПАП), наличие которого обуславливает эффект субстратного торможения при высоких концентрациях субстрата и взаимодействие со специфическими ингибиторами и активаторами АХЭ. У БуХЭ ПАП отсутствует. Таким образом, каталитическая триада — наиболее консервативный элемент АЦ и его аминокислотный состав одинаковый у всех типов холинэстераз, независимо от вида животного. Остальные участки АЦ в той или иной степени подвержены изменчивости в аминокислотных остатках в зависимости от вида организма (Моралев, Розенгарт, 1999; Moralev, Rozengart, 2006).

Собственная ХЭ пивяков с наибольшей скоростью гидролизует АТХ, примерно в два раза с более низкой скоростью — ПрТХ и МеТХ и не способна гидролизовать БуТХ. Субстратная специфичность собственной ХЭ пивяков предполагает, что черви содержат один тип фермента, близкий по свойствам к типичной АХЭ млекопитающих эритроцитов быка. Известно, что у типичной АХЭ высокие концентрации субстратов снижают её активность и избирательным субстратом для неё является МеТХ (Moralev, Rozengart, 2006). Однако от неё ХЭ червей отличается отсутствием эффекта субстратного торможения. Выявленные особенности субстратной специфичности фермента пивяков предполагают, что по конфигурации ацильного кармана ХЭ пивяки близка к типичной АХЭ. Это объясняет снижение скорости гидролиза субстрата при увеличении длины его ацильной части в ряду АТХ, ПрТХ, БуТХ вплоть до полной потери активности в отношении последнего. Наряду с этим, неспособность ХЭ пивяки тормозиться избытком субстратов указывает на отсутствие в её молекуле ПАП.

Чувствительность ХЭ пивяки к параоксону примерно на два порядка меньше, чем у типичной АХЭ эритроцитов быка, значения k_{II} для которой составляют $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ (Чуйко и др., 2002). К действию ДДВФ она на 2–3 порядка более чувствительна по сравнению с типичными АХЭ эритроцитов быка ($k_{II} = 3.5 \times 10^3 - 9.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) (Сазонова и др., 1972; Чуйко и др., 2002; 2005) и на порядок — относительно БуХЭ сыворотки крови лошади ($k_{II} = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$), но имеет сходную чувствительность с БуХЭ пресноводных костистых ($k_{II} = 3.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) (Чуйко и др., 2002). У параоксона ацильная часть представлена более длинным этиловым остатком, а у ДДВФ — более коротким метиловым (Шамшурин, Кример, 1976). Поэтому меньшая чувствительность ХЭ пивяки к параоксону и большая к ДДВФ по сравнению с типичной АХЭ указывает на то, что «ацильный карман» фермента этой пивяки отличается по аминокислотному составу и больше приспособлен для взаимодействия с более короткой ацильной цепочкой.

Известно, если скорости торможения ферментативного гидролиза разных субстратов каким-либо ингибитором одинаковы, то гидролиз осуществляется одним ферментом (Розенгарт, 2001). У *S. fadejewi* каждый из исследованных ингибиторов с одинаковой скоростью тормозит гидролиз трех субстратов (величины k_{II} , как и значения pI_{50} одинаковые), что указывает на наличие одного типа ХЭ у этого вида пивяков.

По субстратно-ингибиторным особенностям ХЭ *C. fadejewi* отличается не только от типичных АХЭ и БуХЭ млекопитающих, но и от изученных ранее ферментов других пресноводных аннелид. Так у плоской пиявки *Glossiphonia complanata* из того же отряда (отр. Rhynchobdellea, сем. Glossiphoniidae) ХЭ имеет низкое сродство к БТХ (Лапкина и др., 2005), но угнетается его избытком наряду с другими субстратами (не опубликованные данные авторов). У 5 представителей бесхоботных пиявок (отр. Arhynchobdellea, сем. Hirudniidae и Ergobdelliidae) ХЭ гидролизует БТХ и сродство к нему выше, чем к АТХ (Лапкина, Стойкова, 1986). “Атипичная” ХЭ олигохеты *Lumbriculus variegatus* наиболее хорошо гидролизует АТХ, остальные три субстрата чуть медленнее, но с близкими скоростями (Chuiko et al., 2011). При этом избыток АТХ и БТХ тормозит её активность, а других двух субстратов нет. Чувствительность ХЭ *C. fadejewi* к ДДВФ ближе всего к ферменту олигохеты *L. variegatus* ($k_{II} = 4.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ с АТХ). В то же время она почти на 2 порядка выше, чем у челюстных пиявок *Haemopsis sanguisuga* и *Hirudo medicinalis* (4.7×10^4 и $6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ соответственно), и на порядок выше, чем у представителей плоских пиявок *G. complanata* и *Helobdella stagnalis* L. (2.3 и $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) (Лапкина, Чуйко, 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что в организме пресноводной пиявки *C. fadejewi* присутствует один тип ХЭ наиболее близкий по субстратной специфичности к типичной АХЭ млекопитающих, но отличающийся от нее отсутствием эффекта субстратного торможения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бресткин А.П., Кузнецова Л.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эпштейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: ТИНРО-Центр, 1997. 466 с. Brestkin A.P., Kuznetsova L.P., Moralev S.N., Rozengart E.V., Epshtein L.M. Kholinesterazy nazemnykh zhyvotnykh i gidrobiontov. Vladivostok: TINRO-Tsentr, 1997. 466 s. [Brestkin A.P., Kuznetsova L.P., Moralev S.N., Rozengart E.V., Epshtein L.M. Cholinesterases of terrestrial and aquatic animals. Vladivostok: TINRO-Center, 1997. 466 p.] In Russian.
- Брик И.Л. Холинэстераза мышц морских червей *Physcosoma japonicum* и *Lumbriconereis impatiens* / В кн.: Биохимическая эволюция. Л.: Наука. 1973. С. 56–66. Brik I.L. Kholinesteraza myshts chervei *Physcosoma japonicum* i *Lumbriconereis impatiens* / V kn.: Biokhimicheskaya evolyutsiya. L.: Nauka, 1973. S. 56–66. [Brik I.L. Cholinesterase of muscles of sea worms *Physcosoma japonicum* and *Lumbriconereis impatiens* / In: Biochemical evolution. L.: Science, 1973. P. 56–66.] In Russian.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. В 3-х томах. Т. 1. М: Мир. 1982. 392с. [Dikson M., Webb E. Enzymes. 3rd. ed., London: Longman Group Limited, 1979.] In Russian.
- Желнин Ю.Ю., Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Активность холинэстераз плазмы крови различных видов пресноводных костистых рыб // Биол. внутр. вод. 1998. № 1. С. 74–79. Zhelnin Yu.Yu., Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Aktivnost' kholiesteraz plazmy krovi razlichnykh vidov presnovodnykh kostistykh ryb // Biol. vnutr. vod. 1988. № 1. S. 74–79. [Zhelnin Yu.Yu., Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Cholinesterase activity in blood plasma of different freshwater teleosts // Inland Water Biology. 1988. No. 1. P. 74–79.] In Russian.
- Лапкина Л.Н., Стойкова О.А. Холинэстеразы пиявок // Биол. внутр. вод. Информ. бюлл. 1986. № 69. С. 29–32. Lapkina L.N., Stoikova O.A. Kholinesterazy piyavok // Biol. vnutr. vod. Inform. byull. 1986. № 69. S. 29–32. [Lapkina L.N., Stoikova O.A. Cholinesterases of leeches // Inland Water Biology. Inform. Bull. No. 69. P. 29–32.] In Russian.
- Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Фрайнд В.В., Куфирина Т.А. Биохимические свойства холинэстеразы пиявки *Glossiphonia complanata* (сем. Glossiphonidae) из Рыбинского водохранилища // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. Матер. IV (XXVII) междунар. конф. Ч. 1 (Вологда, Россия, 5–10 декабря 2005 г.). Вологда, 2005. С. 250–252. Lapkina L.N., Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Fraind V.V., Kufirina T.A. Biokhimicheskie svoistva kholinesterazy piyavki *Glossiphonia complanata* (sem. Glossiphonidae) iz Rybinskogo vodokhranilisha // Biologicheskie resursy Belogo moray i vnutrennikh vodoyemov Evropeiskogo Severa // Mater. IV (XXVII) mezhdunar. konf. Chast' 1 (Vologda, Rossiya, 5–10 dekabrya 2005). Vologda, 2005. S. 250–252. Lapkina L.N., Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Fraind V.V., Kufirina T.A. Biochemical properties of cholinesterase in leech *Glossiphonia complanata* (Glossiphonidae) from the Rybinsk reservoir / Biological resources of White Sea and inland waters of European North // Proceed. IV (XXVII) Inter. Conf. Part 1. (Vologda, Russia, December 5–10, 2005). Vologda, 2005. P. 250–252. In Russian.
- Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Активность холинэстеразы пяти видов кровососущих пиявок, отличающихся биолого-экологическими особенностями // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Матер. II междунар. конф. с элементами школы молод. уч, аспирант. и студ. 11–14 сентября 2007 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. С. 83–84. Lapkina L.N., Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Aktivnost' kholiesterazy pyati vidov krovososushchikh piyavok, otlichayushchikhsya biologo-ekologicheskimi osobennostyami // Sovremennye problem fiziologii i biokhimii vodnykh organizmov. Mater. II inter. Conf. s elementami shkoly molod. uchen., aspir. i studentov. 11–14 sentyabrya 2007. Petrozavodsk: KarNTs, 2007. S. 83–

84. [Lapkina L.N., Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Cholinesterase activity of five species of blood-sucking leeches differing on biological and ecological features // Modern problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Proceed. II Intern. Conf. with elements of school for young scientists, PhD students and college students. September 11–14, 2007. Petrozavodsk: KarSC, 2007. P. 83–84.] In Russian.
- Лапкина Л.Н., Чуйко Г.М. Физиолого-биохимические реакции пиявок на действие фосфорорганических пестицидов // Физиология и токсикология пресноводных животных (Г.М. Чуйко, ред.). Рыбинск: ОАО “Рыбинский дом печати”, 2007. С. 140–177. Lapkina L.N., Chuiko G.M. Fiziologo-biokhimicheskie reaktsii piyavok na deistvie fosfororganicheskikh pestitsidov // Fiziologiya i toksikologiya presnovodnykh zhitvnykh (Chuiko G.M., red.). Rybinsk: ОАО “Rybinskiy dom pečati”, 2007. S. 140–177. [Lapkina L.N., Chuiko G.M. Physiological and biochemical responses of leeches on action of organophosphorus pesticides // Physiology and toxicology of freshwater animals. Rybinsk: OJSC “Rybinsk Print House”, 2007. P. 140–177.] In Russian.
- Моралев С.Н., Розенгарт Е.В. Современные представления о структуре и каталитических свойствах холинэстераз позвоночных и беспозвоночных // Ж. эвол. биохим. физиол. 1999. Т. 35. № 1. С. 3–14. Moralev S.N., Rozengart E.V. Sovremennye predstavleniya o strukture i kataliticheskikh svoistvakh kholinesteraz pozvonochnykh i bespozvonochnykh // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 1999. T. 35. № 1. S. 3–14. [Moralev S.N., Rozengart E.V. Modern views on structure and catalytic properties of cholinesterases of vertebrates and invertebrates // J. Evol. Biochem. Physiol. 1999. Vol. 35. No. 1. P. 3–14.] In Russian.
- Розенгарт Е.В. Субстратно-ингибиторный анализ холинэстеразы гемолимфы тихоокеанского брюхоногого моллюска *Neptunea eulimata* // Ж. эвол. биохим. физиол. 2001. Т. 37. №3. С.165–169. Rozengart E.V. Substratno-ingibitorni analiz kholinesterazy gemolimfy tikhookeanskogo bryukhonogo mollyuska *Neptunea eulimata* // Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 2001. T. 37. №3. P.165–169. [Rozengart E.V. Substrate-inhibitory analysis of cholinesterase of gastropod *Neptunea eulimata* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2001. Vol. 37. No. 3. P. 165–169.] In Russian.
- Сазонова И.Н., Новожилов К.В., Брик И.Л., Андреева Н.А. Холинэстераза гороховой тли *Acyrtosiphon pisi* Kalt. // Биохимия. 1972. Т. 37. № 3. С. 579–584. Sazonova I.N., Novozhilov K.V., Brik I.L., Andreeva N.A. Kholinesteraza gorokhovo tli *Acyrtosiphon pisi* Kalt. // Biokhimiya. 1972. T. 37. № 3. S. 579–584. [Sazonova I.N., Novozhilov K.V., Brik I.L., Andreeva N.A. Cholinesterase of pea aphid *Acyrtosiphon pisi* Kalt. // Biochemistry (Moscow). 1972. Vol. 37. No. 4. P. 579–584.] In Russian.
- Чуйко Г.М., Подгорная В.А. Холинэстеразы пресноводных костистых рыб // Физиология и токсикология пресноводных животных (Г.М. Чуйко, ред.). Рыбинск: ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. С. 100–139. Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Kholinesterazy presnovodnykh kostistyx ryb // Fiziologiya i toksikologiya presnovodnykh zhitvnykh (Chuiko G.M., red.). Rybinsk: ОАО “Rybinskiy dom pečati”, 2007. S. 100–139. [Chuiko G.M., Podgornaya V.A. Cholinesterases of freshwater teleosts // Physiology and toxicology of freshwater animals. Rybinsk: OJSC “Rybinsk Print House”, 2007. P. 100–139.] In Russian.
- Чуйко Г.М., Подгорная В.А., Лаврикова И.В. Фосфорорганическое соединение 0,0-диметил-0-(2,2-дихлорвинил) фосфат как селективный ингибитор для отдельного определения активности ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы у плотвы *Rutilus rutilus*// Ж. эвол. биохим. физиол. 2002. Т. 38, С. 203–207. Chuiko G.M., Podgornaya V.A., Lavrikova I.V. Organophosphorus Compound O,O-Dimethyl-O-(2,2-Dichlorovinyl) Phosphate as Selective Inhibitor for Separate Determination of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in the Roach *Rutilus rutilus* // J. Evolution. Biochemistry and Physiology, Vol. 38. No. 3, 2002, pp. 264–269. DOI: 10.1023/A:1020724308112] In Russian.
- Чуйко Г.М., Портли Н.М., Подгорная В.А., Бороздинская О.А. Ацетилхолинэстераза мозга окуня (*Perca fluviatilis* L.) из Рыбинского водохранилища // Н.Н. Немова (ред). Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов. Мат. междунар. конф 6–9 сентября 2004 г., Петрозаводск, Республика Карелия, Россия. Петрозаводск: ИБ КарНЦ РАН, 2005. С. 202–207. Chuiko G.M., Portley N.M., Podgornaya V.A., Borozdinskaya O.A. Atsetilkholinesteraza mozga okunya (*Perca fluviatilis* L.) iz Rybinskogo vodokhranilishcha // N.N. Nemova (red.). Sovremennye problem fiziologii i biokhimii wodnykh organizmov. Mater. mezhd. konf. 6–9 sentyabrya 2004, Petrozavodsk, Respublika Kareliya, Rossiya. Petrozavodsk: Inst. Biol. KarNTs RAN, 2005. S. 202–207. [Chuiko G.M., Portley N.M., Podgornaya V.A., Borozdinskaya O.A. Brain acetylcholinesterase of perch (*Perca fluviatilis* L.) from the Rybinsk reservoir // N.N. Nemova (ed.). Modern problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms. Proceed. Intern. Conf. September 6–9, 2004, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia. Petrozavodsk: KarSC, 2004. P. 202–207.] In Russian.
- Шамшураин А.А., Кример М.З. Физико-химические свойства пестицидов. Справочник. М.: Химия, 1976. 328 с. Shamshurin A.A., Krimer M.Z. Fiziko-khimicheskie svoistva pestitsidov. Spravochnik. M.: Khimiya, 1976. 328 s. [Shamshurin A.A., Krimer M.Z. Physical and chemical properties of pesticides. Handbook. M.: Publishing house Chemistry. 1976. 328 p.] In Russian.
- Andersen R.A., Aune, T., Barstad, J.A. Characteristics of cholinesterase of the earthworm *Eisenia foetida*// Comp. Biochem. Physiol. 1978. Vol. 61C. No. 1. P. 81–87.
- Augustinsson K–B. Substrate concentration and specificity of choline ester-splitting enzymes // Arch. Biochem. 1949. Vol. 23. P. 111–126.

- Caselli F., Gastaldi L., Gambi N., Fabbri E. *In vitro* characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei* // *Comp. Biochem. Physiol.* 2006. Vol. 143C. No. 4. P. 416–421.
- Chuiko G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide // *Comp. Biochem. Physiol.* 2000. Vol. 127C, No. 3. P. 233–242.
- Chuiko G.M., Lapkina L.N., Podgornaya V.A. Substrate-inhibitory analysis of the cholinesterase in the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus* (O.F. Müller, 1773; Lumbriculidae, Oligochaeta) // *Biochem. System. Ecol.* 2011. Vol. 39. No. 3. P. 169–174.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity // *Biochem. Pharmacol.* 1961. Vol.7. P. 88–95.
- Moralev, S.N., Rozengart, E.V., Comparative enzymology of cholinesterase. La Jola, CA: International University Line, 2006. 487 p.
- Principato, G.B. Contenti, S., Talesa V., Mangiabene, C., Pascolini, R. & Rosi, G. Propionylcholinesterase from *Allolobophora caliginosa* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. Vol. 94C. P. 23–27.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. *Biometry. The principals and practice of statistics in biological research.* NY.: W.H. Freeman&Co. 1995. 887 p.
- Talesa V., Grauso M., Giovannini E., Rosi G., Toutant J–P. Solubilization, molecular forms, purification and substrate specificity of two acetylcholinesterases in the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) // *Biochem. J.* 1995. Vol. 306. P. 687–692.

SUBSTRATE-INHIBITORY ANALYSIS OF CHOLINESTERASE FRESHWATER LEECH *CASPIOBELLA FADEJEWI* (Epstein) (*PISCICOLLIDAE*)

Lapkina L.N., Chuiko G.M., Podgornaya V.A.

*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Nekouz, Yaroslavl, Russia, e-mail: lapkina@ibiw.yaroslavl.ru*

The basic biochemical properties and kinetics of cholinesterase (ChE) of *Caspiobdella fadejewi* (Epstein) (Rhynchobdellea, Piscicolidae), representative of a class of leeches, were studied. It was found that the values of the enzyme kinetics for different substrates, except PrTCh and MeTCh, differ significantly. The ratio of hydrolysis rates for ATCh : PrTCh : BuTCh : MeT is 100: 74: 13: 59, the V values vary within the range of 3.8 to 0.48 mmol/g/min with ATX and BuTCh respectively. Effect of substrate inhibition is absent for all substrates studied. Leech ChE has greatest affinity to ATCh ($K_m = 2.64 \times 10^{-4}$ M), and the minimum to BuTCh ($K_m = 22.2 \times 10^{-4}$ M), which is confirmed by the values of the indicator V / K_m . The organophosphorus inhibitors, DDVP and paraoxon, inhibit hydrolysis of the three substrates at the same speeds (k_{II} as well as $pI50$ has a same values). The substrate-inhibitory analysis shows that the leech has only one ChE, differing by properties from a typical AChE and BuChE vertebrates and other previously studied annelids.

Keywords: cholinesterase, leeches, activity, substrate specificity, inhibitors.

*А. М. Андреева, Д. В. Гарина, В. К. Голованов, И. Л. Голованова, Е. И. Головкина, Е. Г. Евдокимов,
Е. А. Заботкина, Д. С. Капшай, В. Т. Комов, В. В. Кузьмина, Т. Б. Лапирова, Л. Н. Лапкина,
А. С. Маврин, В. И. Мартемьянов, П. В. Меньшакова, Т. А. Нестерова, И. А. Парфенова,
В. А. Подгорная, И. П. Рябцева, В. Е. Середняков, А. К. Смирнов, А. А. Солдатов, Г. А. Урванцева,
Р. А. Федоров, А. А. Филиппов, Г. М. Чуйко*

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Фото на обложке: автор Г.М. Чуйко, 2009. Коллаж — научно-аналитическое оборудование лаборатории физиологии и токсикологии водных животных ИБВВ РАН (сверху вниз и слева направо): люминесцентный спектрофотометр LS55 (Perkin Elmer, USA), анализатор ртути РА-915+ с пиролитической приставкой ПИРО-915+ (Люмэкс, СПб, Россия), лабораторная экспериментальная нерестовая установка для получения икры рыб данио-рерио, оптико-цифровой комплекс на базе микроскопа Микромед МС-2-ZOOM var. 2CR (Оптические приборы, СПб, Россия) для наблюдения за беспозвоночными и икрой рыб, спектрофотометр UV-VIS Lambda25 (Perkin Elmer, USA).

Подписано в печать 01.02. 2016. Формат 60 х90 1/8
Усл. печ. л. 16.75 Заказ № 682. Тираж 150 экз.

Отпечатано в типографии ООО “Канцлер”
15000, г. Ярославль, ул. Полушкина роща, д. 16,
kancler2007@yandex.ru