

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ОНТОГЕНЕЗА РЫБ

***ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ***

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2001

УДК 574.5
ББК 28.081
Э 40

Экологические проблемы онтогенеза рыб физиолого-биохимические аспекты - М. Изд-во МГУ. 2001 - 304 с

Сборник посвящен анализу экологических особенностей индивидуального развития рыб. Рассмотрены физиолого-биохимические аспекты онтогенеза рыб, развивающихся в различных экологических условиях, а также влияние факторов среды на развитие. Особое внимание уделено анализу становления различных физиологических и биохимических систем в ходе онтогенеза этих животных.

Для экологов, эмбриологов, ихтиологов, физиологов, студентов биологических факультетов

Ответственный редактор

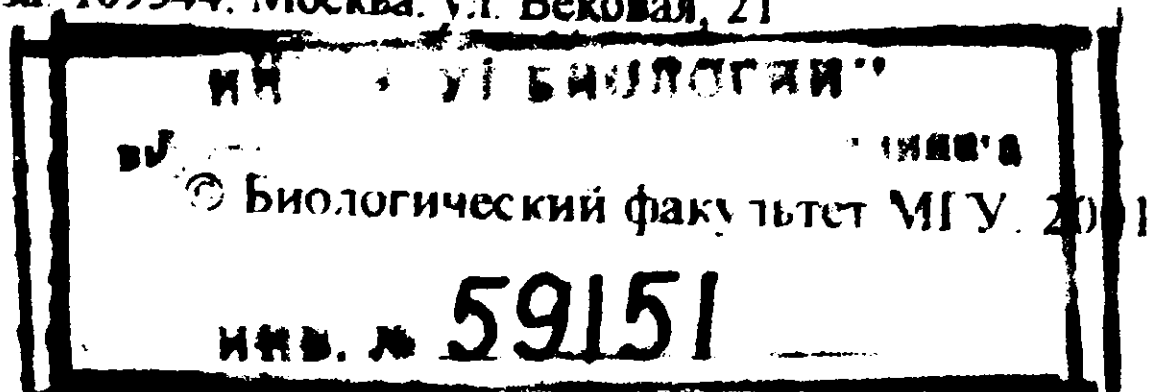
Н.Д. ОЗЕРНЮК

Научное издание

**ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ОНТОГЕНЕЗА РЫБ
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Изд. лиц. №040417 от 18.04.97. Подписано в печать 12.04.01
Формат 60 x 84/16 Бумага офс. №1. Офсетная печать
Усл. печ. л. 17,74 Уч.-изд. л. 17,8 Тираж 500 экз. Заказ №
Ордена «Знак Почета» Издательство Московского университета
103009 Москва, ул. Б. Никитская, 5/7.
Типография Центросоюза. 109544. Москва, ул. Вековая, 21

ISBN 5-211-04022-8



ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ОНТОГЕНЕЗА РЫБ.

В изучении экологических особенностей индивидуального развития рыб и, в частности, физиологических и биохимических аспектов данной проблемы, в отечественной науке достигнуты существенные успехи. Прежде всего, эти достижения отражают состояние исследований в области биологии развития, ихтиологии, экологии, физиологии и биохимии у нас в стране.

Следует отметить основные научные направления, изучением которых занято большинство научных коллективов, работающих в области экологических проблем онтогенеза рыб. Это исследование формирования основных систем и органов рыб в ходе онтогенеза; динамика физиологического и метаболического состояния рыб на разных этапах индивидуального развития; влияние различных экологических факторов на онтогенез; использование физиологических и биохимических показателей для оценки состояния развивающихся рыб при антропогенных воздействиях. Каждый из этих разделов включает несколько конкретных направлений исследований, которые в итоге охватывают практически весь спектр подходов к анализу экологических проблем биологии развития рыб. Следует отметить, что в настоящее время не все направления смогли сохранить прежний уровень исследований.

Для современного этапа развития исследований экологических проблем онтогенеза рыб характерны две основные тенденции. 1 Широкое использование современных методов и технологий для анализа физиолого-биохимических особенностей развивающихся рыб.

2 Применение интегральных подходов к данной проблеме, которые позволяют создать обобщенную картину влияния условий среды на онтогенез рыб.

Эти подходы разрабатываются в ряде научных учреждений страны: Институте биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Биологическом факультете МГУ, Институте биологии Карельского научного центра РАН, Центральной лаборатории по воспроизводству рыбных запасов в Санкт-Петербурге, Биологическом институте Санкт-Петербургского государственного университета, Институте биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, Институте цитологии РАН, Институте океанологии РАН, ВНИРО и др.

В настоящее время достигнуты успехи в изучении динамики энергетического метаболизма в ходе онтогенеза рыб различных экологических, особенностей влияния факторов среды (прежде всего, температуры) на развитие, а также гормональных механизмов созревания (ИБР РАН). Существенные результаты получены при изучении формирования поведенческих реакций в ходе онтогенеза рыб, а также возрастных изменений обмена веществ и периодизации индивидуального развития этих животных (ИПЭЭ РАН). На Биологическом факультете МГУ успешно исследуются экологические закономерности становления дыхательной функции в онтогенезе рыб, развитие обонятельной и вкусовой систем, влияние температуры на процессы роста, а также эндокринные механизмы раннего онтогенеза. Существенные успехи достигнуты в изучении эндокринных механизмов на различных этапах индивидуального развития рыб, а также анализа механизмов созревания (НИИ физиологии СПбГУ и Центральная лаборатория по воспроизводству рыбных запасов в Санкт-Петербурге). Структурные и функциональные особенности эндокринной системы в ходе развития рыб исследуются в Институте цитологии РАН. В Институте биологии Карельского научного центра РАН успешно проводится комплексное изучение эколого-биохимических закономерностей онтогенеза рыб и, в частности, динамики метаболизма липидов и ряда ферментов, участвующих в адаптационных процессах этих животных. Экологические особенности оогенеза рыб, а также гормональные механизмы развития изучаются в Биологическом институте СПбГУ. В Институте биологии внутренних вод РАН проводится изучение становления физиологических механизмов температурных реакций на разных этапах онтогенеза

рыб, особенности иммунной системы и нервной регуляции, а также динамики белков крови в ходе развития. Интересные результаты получены при исследовании влияния экологических факторов на формирование репродуктивного потенциала рыб (Институт океанологии РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии - ВНИРО)

В каждом из этих центров были созданы отдельные оригинальные направления физиолого-биохимических исследований рыб. Традиции, заложенные ранее, во многих случаях удается поддерживать и в настоящее время. Комплексное изучение тех или иных проблем онтогенеза рыб в данных центрах может служить точками роста будущих исследований.

В апреле 1998 г. в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН (Борок Ярославской обл.) был проведен Всероссийский симпозиум «Возрастная и экологическая физиология рыб», в котором приняли участие исследователи из Москвы, Санкт-Петербурга, Петрозаводска и других городов. В настоящий сборник вошли материалы этого симпозиума

Н.Д. Озернюк

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ

ОЗЕРНЮК Н.Д.

ТЕМПЕРАТУРНЫЕ АДАПТАЦИИ МЕТАБОЛИЗМА В ОНТОГЕНЕЗЕ РЫБ

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

Температурные адаптации пойкилотермных и, в частности, рыб имеют важнейшее значение для распространения и выживания этих животных в различных климатических зонах. Одним из наиболее существенных элементов комплекса температурных адаптаций является энергетический метаболизм, поскольку его уровень неуклонно падает при понижении температуры среды, что должно создавать серьезные проблемы энергообеспечения этих животных. В ходе раннего онтогенеза рыб происходит становление адаптационных механизмов, обеспечивающих эффективное функционирование различных метаболических звеньев в разных температурных условиях среды. Сочетание генотипических и фенотипических механизмов позволяет рыбам на разных стадиях онтогенеза адаптироваться к температурам среды обитания, а также к долговременным и кратковременным изменениям температурных условий.

Филогенетические адаптации метаболизма рыб, развивающихся в различных температурных условиях

Онтогенез различных видов животных в природе, протекающий в разных температурных условиях и, в особенности, экстремальных, обеспечивается комплексом специфических адаптационных механизмов. Эти механизмы затрагивают разные уровни развития: молекулярно-генетический, биохимический, тканевой, физиологический и др. Принципиально речь идет о двух типах фундаментальных адаптационных механизмов: фенотипических и генотипических. Очевидно, что обитание животных в различных температурных условиях, а также

их развитие, обеспечивается, в первую очередь, генотипическими (филогенетическими) механизмами. Эти механизмы определяют характер метаболизма животных, развивающихся при разных температурах. Данные механизмы обеспечивают настройку метаболизма на наиболее эффективное функционирование различных реакций при температурах обитания. Это относится как к интегральным показателям энергетического метаболизма (например, суммарное потребление кислорода), так и к отдельным метаболическим реакциям, в первую очередь ферментативным.

Потребление кислорода. Одним из основных интегральных показателей энергетического метаболизма служит интенсивность дыхания, в частности, суммарное потребление кислорода (Зотин, Озернюк, 1966; Озернюк, 1985, 1992, 2000а, б). Этот показатель метаболизма, рассчитывается как потребление кислорода за время продолжительности той или иной стадии развития (O_2/t_0) (Детлаф, Детлаф, 1960), зависящей от температуры (Зотин, Озернюк, 1966). Минимальный уровень суммарного потребления кислорода свидетельствует о наиболее эффективном и экономном энергообеспечении той или иной стадии развития. Было установлено, в частности, что минимальный уровень этого показателя для зародышей лососевых рыб, развивающихся при низких температурах среды, расположен в зоне низких температур (Озернюк, 1985), тогда как для осетровых и карповых он находится в области умеренных температур. Таким образом, дыхательный метаболизм рыб, развивающихся в разных температурных условиях, наиболее эффективен в области температур обитания, что можно рассматривать как следствие комплекса генотипических температурных адаптаций метаболизма.

Свойства ферментов. Механизмы адаптаций метаболизма к температуре среды обитания целесообразно рассматривать на примере отдельных реакций, катализируемых ферментами. В качестве модели для изучения температурных адаптаций ферментов использовали лактатдегидрогеназу (ЛДГ) из зародышей рыб, развивающихся при разных температурах среды (Klyachko, Ozernyuk, 1994, 1998, Клячко, Озернюк, 1995; Озернюк, 2000а, б). В экстрактах зародышей рыб на стадии гаструлы определяли величину K_m для пирувата, которая характеризует в конечном счете фермент-субстратное сродство, зависящее от температуры.

Было установлено, что наименьшая величина K_m свидетельст-

вующая о максимальном фермент-субстратном сродстве, для зародышей холодолюбивых рыб (радужная форель, атлантический лосось, сибирская ряпушка, байкальский омуль) отмечена в зоне низких температур (5-8°C) (табл. 1). У зародышей теплолюбивых золотой рыбки, карпа и данио минимум K_m находится в области высоких температур (25-28°C), а у зародышей рыб, развивающихся в умеренных температурных условиях (осетр, выюн), минимальная величина K_m расположена в зоне средних температур (13-16°C).

Таблица 1.

Положение температурного минимума K_m и энергия активации Аррениуса (E_a) для ЛДГ из зародышей разных видов рыб на стадии бластулы (Klyachko, Ozerov, 1998).

Виды рыб	Температура развития, °C	Температурный минимум K_m , °C	E_a , ккал/моль
Атлантический лосось	4-8	8	10,92±0,33
Радужная форель	4-8	7	10,77±0,21
Сибирская ряпушка	5-8	5	-
Байкальский омуль	3-8	8	-
Сибирский осетр	12-18	13	18,72±1,29
Вьюн	12-18	13	16,17±0,48
Золотая рыбка	22-26	24	-
Карп	24-28	26	-
Данио	25-28	28	18,63±0,46

Из этих данных следует, что температурный минимум K_m для ЛДГ в общем виде соответствует оптимальным температурам развития зародышей. В области оптимальных температур наблюдается максимальная скорость фермент-субстратного взаимодействия, что можно рассматривать как одну из важнейших особенностей метаболических адаптаций. Очевидно, что наиболее эффективное функционирование ферментативных реакций при температурах развития (обитания) рыб является следствием генотипических адаптаций.

Энергетические параметры ферментативных реакций у животных, развивающихся при разных температурах среды, также отличаются (табл. 1). В частности, величина энергии активации Аррениуса (E_a) для ЛДГ из зародышей холодолюбивых рыб (радужной форели и атлантического лосося) имеет более низкие значения, чем для рыб, развивающихся при высоких и умеренных температурах (табл. 1) Бо-

лее низкая величина E_a для зародышей холодолюбивых рыб, как и для половозрелых рыб (Хочачка, Сомеро, 1977, 1988), служит метаболической адаптацией компенсаторного характера, направленной на поддержание необходимого уровня ферментативного катализа при низких температурах среды.

Температурные адаптации ферментов зародышей рыб отражаются также на уровне термостабильности этих белков. Так, наименьшая теплоустойчивость ЛДГ характерна для зародышей холодолюбивых атлантического лосося и радужной форели (T_{50} равна 69°C), тогда как для рыб, развивающихся при высоких и умеренных температурах, этот показатель более высокий (T_{50} от 71°C до 75°C).

Молекулярно-генетические механизмы термостабильности ферментов. Отмеченные различия в структурных и функциональных свойствах ЛДГ обусловлены генотипическими адаптациями и связаны в конечном счете с первичной структурой этого фермента, т.е. аминокислотными заменами. Данный вопрос был исследован на примере шести видов барракуд (сем. *Sphyrnidae*), отличающихся температурой обитания (Holland et al., 1997). У этих видов рыб величина K_m для ЛДГ из скелетных мышц и термостабильность фермента различается в соответствии с температурой их обитания. У данных рыб была определена аминокислотная последовательность ЛДГ- M_4 на основе анализа первичной структуры кДНК. В ферменте этих видов было выявлено четыре аминокислотных замены. В частности, первичная структура ЛДГ северного вида *Sphyrna argentea* отличается от структуры субтропического вида *Sphyrna lucasana* и южного вида *Sphyrna idiaestes* заменами аминокислот в позициях 8, 61, 68 и 223. Предполагается (Holland et al., 1997), что отличия в позициях 61 и/или 68 определяют различные величины K_m для ЛДГ *Sphyrna argentea* и *Sphyrna lucasana*, хотя эти замены расположены вне активного центра фермента. Далее авторы считают, что аминокислотная замена в позиции 8 объясняет различия в термостабильности фермента двух видов барракуд. Из этих данных следует, что даже небольшое количество замен аминокислот в молекуле ЛДГ, удаленных от активного центра или от района петли, обратимо закрывающей полость активного центра, может вызывать существенное изменение кинетических свойств и термостабильности фермента.

Взаимосвязь первичной структуры ЛДГ, ее свойств и температуры обитания была проанализирована на примере 9 видов нототение-

вых рыб, обитающих в Антарктиде при температуре от -1.8°C до $+1^{\circ}\text{C}$, а также трех видов этих рыб, живущих в водах Южной Америки при $4-10^{\circ}\text{C}$ (Fields, Somero, 1998). Адаптация рыб Антарктиды к низким температурам шла по пути замен аминокислот, увеличивающих гибкость молекулы фермента в отдельных ее участках. Оказалось, что эти замены не затрагивают активный центр фермента и район петли, закрывающий его полость, однако они опосредованно меняют структуру каталитических участков молекулы, влияя на его функциональные и структурные свойства.

Молекулярные механизмы термостабильности ЛДГ у рыб, обитающих при разных температурах среды, анализировались при сравнении холодолюбивых нототениевых Антарктиды и других костистых рыб, а также колючей акулы *Squalus acanthias*, обитающих в зоне умеренных температур (Fields, Somero, 1998). Различия в стабильности ЛДГ этих двух групп рыб проявляются в двух районах молекулы фермента: α -спирали αH и в районе протяженной петли, соединяющей β -структуру βH и α -спираль αIG . Спираль αH принимает участие в формировании структуры активного центра и тесно контактирует с α -спиралью αD каталитической петли. В молекуле ЛДГ большинства костистых рыб, а также колючей акулы, обитающих при умеренных и высоких температурах, в начале спирали αH расположен пролин, создающий определенную жесткость этому району молекулы фермента. У нототениевых рыб в спирали αH произошла аминокислотная замена: пролин заменен на аланин. Эта замена обеспечила более гибкую структуру данного участка молекулы, что имеет особо важное значение для гибкости фермента и осуществления его каталитической функции при экстремально низких температурах среды.

Описанные молекулярные механизмы генотипических адаптаций к низким температурам среды, по-видимому, должны лежать в основе рассматриваемых здесь адаптационных механизмов ферментов в зародышах рыб, развивающихся в разных температурных условиях.

Онтогенетические температурные адаптации метаболизма развивающихся рыб

Кратковременные изменения температуры среды приводят к формированию фенотипических (онтогенетических) приспособительных механизмов. Медленное изменение температуры ведет к посте-

пенному изменению метаболических процессов, а быстрое – к резкому изменению, включающему начальный этап избыточного реагирования (овершут) с последующей стабилизацией на уровне, соответствующем в общем виде температурному коэффициенту Q_{10} .

Развитие многих рыб в природе (например, лососевых) протекает при меняющихся температурах среды. Поскольку период раннего онтогенеза этих видов достаточно продолжительный, они должны адаптироваться к меняющимся температурным условиям и эти адаптации затрагивают, естественно, метаболизм развивающихся зародышей. Для анализа температурной зависимости метаболизма на разных этапах онтогенеза была изучена зависимость кинетических параметров ЛДГ от температуры в ходе развития радужной форели (Клячко, Озернюк, 1991, Озернюк, 1993, 2000б).

Начальные этапы зародышевого развития радужной форели в природе протекают при низких температурах среды и в течение эмбриогенеза, который продолжается примерно шесть месяцев, естественная температура водоемов постепенно повышается. Первая половина эмбрионального развития этого вида рыб в условиях заводского выращивания протекает примерно при 5°C . Было установлено (Клячко, Озернюк, 1991), что для развивающихся зародышей на стадии гаструлы величина K_m для ЛДГ имеет минимальное значение при $5-7,5^{\circ}\text{C}$. На более поздней стадии развития (накануне вылупления зародышей) температура инкубации возрастала до 8°C и положение минимума K_m также смещалось в сторону более высоких температур. На последующих этапах (после перехода личинок на внешнее питание) температура инкубации увеличивалась до $12-13^{\circ}\text{C}$. В соответствии с этим возрастала температура, при которой величина K_m для ЛДГ из скелетных мышц личинок была минимальной. Таким образом, направленность изменений кинетических свойств ЛДГ в ходе развития форели совпадает с направлением дрейфа температур в природе.

Каковы механизмы изменения кинетических свойств ЛДГ в ходе развития форели? Для анализа данного вопроса икру выращивали не при меняющейся температуре, как это имеет место в природе, а при постоянной (5°C). В данном случае положение минимума K_m для ЛДГ из зародышей на ранних стадиях развития (гаструляция) и на поздних (перед вылуплением) практически не меняется. Следовательно, обнаруженный дрейф кинетических свойств ЛДГ имеет фенотипическую природу и связан с характером изменения температуры среды

Таким образом, адаптации к температурам среды обитания, а также к долговременным и кратковременным изменениям температурных условий, обеспечиваемые комплексом генотипических (филогенетических) и фенотипических (онтогенетических) механизмов, позволяют рыбам занимать экологические ниши с самыми разнообразными температурными условиями, в том числе и экстремальными.

ЛИТЕРАТУРА

- Детлаф Т. А., Детлаф А. А. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // Докл. АН СССР. 1960. 134, 199-202.
- Зотин А. И., Озернюк Н. Д. Влияние температуры на дыхание и уровень АТФ в период дробления яиц выюна // Докл. АН СССР. 1966. 171, 1002-1004.
- Клячко О. С., Озернюк Н. Д. Температурные адаптации метаболизма: влияние температуры на кинетические свойства лактатдегидрогеназы (K_m) во время развития разных видов рыб // Докл. АН СССР. 1991. 319, 1252-1255.
- Клячко О. С., Озернюк Н. Д. Биохимические механизмы адаптации зародышей разных видов рыб // Докл. Акад. наук. 1995. 345, 427-430.
- Озернюк Н. Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: «Наука». 1985. 175 с.
- Озернюк Н. Д. Механизмы адаптаций. М.: «Наука». 1992. 272 с.
- Озернюк Н. Д. Температурные адаптации. М.: Изд-во Московского ун-та. 2000а. 205 с.
- Озернюк Н. Д. Биоэнергетика онтогенеза. М.: Изд-во Московского ун-та. 2000б. 259 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир. 1977. 398 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 1988. 567 с.
- Fields P. A., Somero G. N. Hot spots in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioid fishes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. 98, 11476-11481.
- Holland L. Z., Mcfallngai V., Somero G. N. Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of barracuda fishes (Genus *Sphyræna*) from different thermal environments: differences in kinetic properties in thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site // Biochemistry. 1997. 36, 3207-3215.
- Klyachko O. S., Ozernyuk N. D. The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from various fish species // Comp. Biochem. Physiol. 1994. 107B, 593-595.
- Klyachko O. S., Ozernyuk N. D. Functional and structural properties of lactate dehydrogenase from embryos of different fishes // Comp. Biochem. Physiol., 1998. 119B, 77-80.

ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПЕРИОДИЗАЦИИ ОНТОГЕНЕЗА РЫБ

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

Совмещение возрастных эколого-физиологических исследований рыб с представлениями о периодизации их индивидуального развития позволяет выявить физиолого-биохимическую специфику отдельных периодов онтогенеза, показать обменные механизмы изменений экологии особи в течение ее жизни.

На основе предложенной рядом исследователей периодизации (Северцов, 1939; Расс, 1948; Крыжановский, 1949; Дрягин, 1961; Никольский, 1965) с добавлением периода достижения половой зрелости, процесс индивидуального развития рыб разделен на ряд последовательных периодов, характеризующихся определенными особенностями обмена веществ и спецификой отношений организма со средой: эмбриональный, личиночный, ювенильный периоды; периоды достижения половой зрелости, зрелого состояния организма, старения.

Эмбриональный период. В течение большей части периода процессы роста, развития и энергетического обмена организма обеспечиваются запасными веществами желтка. От момента оплодотворения икры до перехода личинки на внешнее питание эти вещества расходуются в определенной последовательности и с определенной скоростью; процессы дифференцировки и энергетического обмена в это время обеспечиваются главным образом энергией окисления углеводов, в энергетический обмен также вовлекаются запасные белковые фракции желтка и липиды. Общая масса сухого вещества от оплодотворения до перехода на внешнее питание у исследованных нами лососевых и тресковых рыб снижается в среднем на 40%. Этот уровень, как показывают и данные других исследований, является общим для личинок рыб с разной экологией (Шатуновский, 1980; Новиков, 2000).

Личиночный период После перехода на внешнее питание длина и масса личинок быстро увеличиваются; параллельно с белковым ростом накапливается жир, повышается калорийность; снижается обводненность. В конце периода вновь наблюдаются значительные изме-

нения в обмене веществ, связанные с превращением личинки в малька.

В ходе эмбрионального и личиночного периодов меняется фракционный и жирнокислотный состав липидов увеличивается доля структурных липидов - фосфолипидов и холестерина, снижается доля триглицеридов и эфиров стерина - «запасных» фракций липидов.

В периоды смены характера взаимоотношений эмбрионов и личинок исследованных видов рыб со средой - при вылуплении и переходе на внешнее питание - наблюдаются резкие перестройки в характере обмена веществ, связанные с мобилизацией наиболее лабильных энергетических источников - углеводов и незэстерифицированных жирных кислот, а также определенных фракций запасных белков, легко вовлекающихся в энергетический обмен. В эти же моменты значительно возрастает скорость включения углеродной метки в мобилизуемые энергетические соединения (Карзинкин и др., 1970), а также интенсивность дыхания (Рыжков, 1976; Шатуновский, 1980; Озернюк, 1985; Новиков, 2000). Вылупление и переход на внешнее питание требуют дополнительных энергозатрат, которые обеспечиваются за счет окисления глюкозы и высоконенасыщенных жирных кислот, особенно докозагексаеновой кислоты, играющей важнейшую роль в обмене липидов ранних стадий развития рыб.

Ювенильный период. В течение этого периода происходит интенсивный линейный и весовой рост рыб. В их органах и тканях постоянно увеличивается содержание углеводов и незэстерифицированных жирных кислот, обеспечивающих растущий активный обмен. Продолжает повышаться жирность и калорийность организма (рис. 1), снижается относительное содержание структурных липидов - фосфолипидов и холестерина, накапливаются триглицериды.

Ювенильный период завершается с началом трофоплазматического роста ооцитов самок и с началом образования сперматозондов у самцов. Образование первичных половых клеток, гоний, затем ооцитов и сперматозондов, протоплазматический рост ооцитов и формирование сперматид у самцов происходит в раннем онтогенезе (Персов, 1969), однако процессы дифференцировки и первичного роста половых клеток очевидно не связаны в это время со значительными затратами пластических и энергетических веществ; с физиологической и биохимической точки зрения в это время они не оказывают определяющего воздействия на обмен веществ организма. Следовательно, генеративный обмен, как форма пластического обмена, в течение ювенильного пери-

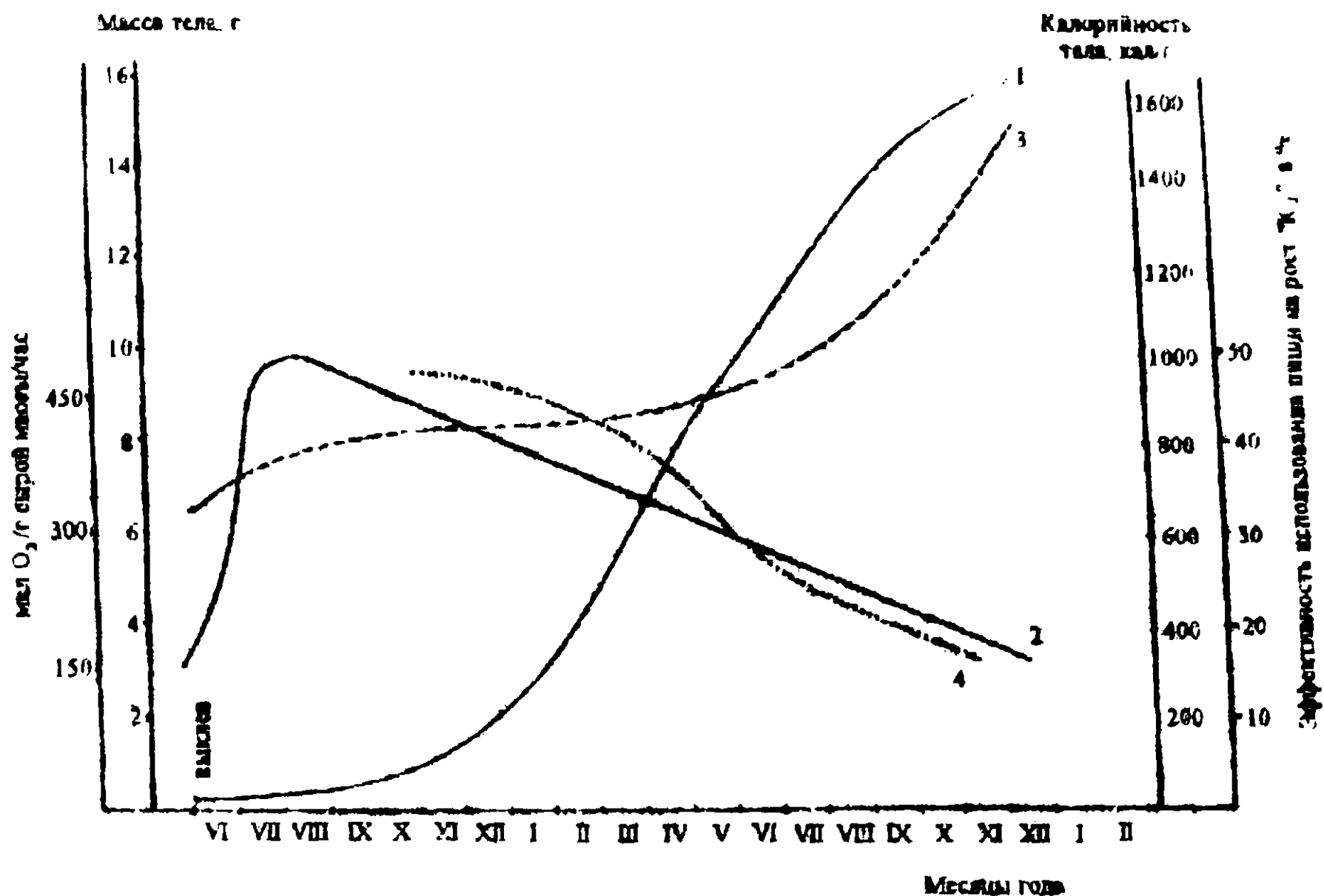


Рис. 1. Динамика ряда физиологических и биохимических показателей в раннем онтогенезе стальноголового лосося: 1 - масса тела в течение 1-2-го года жизни, г; 2 - интенсивность потребления кислорода, мкл O_2 /г сырой массы/час; 3 - калорийность тела, кал/г; 4 - коэффициент использования пищи на рост (в %%)

ода не играет заметной роли в организме, не влияет практически на процессы соматического роста, на характер протекания основных функций: питания, дыхания, роста, движения. В конце ювенильного периода начинается подготовка к переходу в следующий период развития, в пределах которого достигается половая зрелость.

Период достижения половой зрелости. Половому созреванию предшествует накопление в организме рыб определенных ресурсов пластических и энергетических веществ. Происходят значительные качественные изменения белков и липидов: так в печени и в межклеточных пространствах мышечной ткани накапливаются белки с преобладанием нейтральных аминокислот, структурные липиды, высоконенасыщенные жирные кислоты (Шатуновский и др., 1972, 1975). В пределах отдельных поколений половой зрелости прежде всего дости-

гают те особи, которые в течение ювенильного периода характеризовались повышенной скоростью роста и жиронакопления (Шатуновский, Белянина, 1967). Однако, непосредственно в год достижения половой зрелости скорость линейного роста таких рыб пониженная, так как значительная часть ассимилированной пищи используется не на прирост белка, а на отложение жира. Если темпы ежегодного увеличения содержания жира в организме в течение ювенильного периода были равномерными, то в период достижения половой зрелости жиронакопление резко возрастает. Анализ собственных и литературных данных по годовым энергетическим бюджетам рыб разной экологии показал, что в этот период коэффициент использования ассимилированной пищи на рост у бентофагов (камбал) снижается в среднем на 15-25%, у хищников (трески) на 25-35%, у планктофагов (сельди и сардины) на 50% (Hatanaka et al., 1956a, 1956b; Lasker, 1970; Daan, 1975; Шатуновский, 1980). В период достижения половой зрелости в систему общего обмена включается генеративный обмен. С этого времени в организме в первую очередь обеспечиваются оптимальные метаболические условия для роста и развития гамет. Основываясь на значениях происходящих в это время изменений обмена веществ для хода онтогенеза, мы выделили отдельный период - достижения половой зрелости.

Для всех исследованных видов рыб важным индикатором начала полового созревания является изменение метаболической активности печени. Перед началом активного гаметогенеза в печени самок и самцов исследованных видов рыб накапливаются определенные фракции белков и липидов (фосфопротейны, фосфолипиды, эфиры стериннов), транспортируемые затем кровью в развивающиеся гонады. Достижение половой зрелости у самок связано с более значительным накоплением пластических и энергетических ресурсов, чем у самцов.

Период половой зрелости. Начало этого периода связано с участием отдельных особей в процессе воспроизводства. Каждый последующий нерест у полициклических рыб происходит при разном физиологическом состоянии организма. В онтогенезе постоянно снижается доля пластического и увеличивается доля энергетического обмена. Как показано рядом авторов, скорости этих процессов неодинаковы у представителей различных экологических групп. Так, у планктофагов (кильки, сельди, сардины) эффективность использования пищи на рост (коэффициент K_2) с увеличением возраста, массы тела и постоянного уменьшения относительных размеров потребляемых пищевых орга-

низмов снижается наиболее резко, с 20% у годовиков до 1-3% - у шестигодовиков (Lasker, 1970; Липская и др., 1975; Шатуновский, 1980)

Период старения. Вследствие огромной изменчивости масштабов белкового роста и сроков достижения половой зрелости признаки физиологического старения у рыб прослеживаются в значительно большем возрастном интервале, чем у высших позвоночных. Они проявляются в резком снижении эффективности роста, содержания жира и гликогена, а также интенсивности их синтеза, в снижении доли генеративного обмена в общем балансе вещества и энергии, в ряде случаев в нарушениях репродуктивной функции (Шатуновский, 1980). Кроме этого, с возрастом нарастает эндокринный дисбаланс, и нарушаются гомеостатические механизмы (Поленов, 1975; Христофоров, 1975).

Признаки старения у рыб начинают проявляться в течение предыдущего периода онтогенеза в определенной последовательности: сначала снижается эффективность белкового роста, затем интенсивность жиронакопления, еще позднее наблюдаются сдвиги в количественных и качественных показателях воспроизводительной системы (снижается абсолютная и относительная плодовитость, нарушается оптимальное соотношение между содержанием жира и белка в зрелой икре). У самцов большинства изученных видов рыб признаки старения отмечены в более раннем возрасте, чем у самок (Шатуновский, 1980).

Значение онтогенетических изменений показателей отдельных форм обмена состоит в обеспечении выживания особи до наступления репродуктивного возраста и в обеспечении ее эффективного участия в процессе воспроизводства. Постоянное увеличение содержания энергетических веществ в организме, также как увеличение кислородной емкости крови, представляет собой физиолого-биохимическую основу увеличения двигательной активности рыб и протяженности их миграций в онтогенезе. В свою очередь увеличение активного обмена способствует расширению нагульного ареала особи по мере ее роста и развития и также обеспечивает ее выживание и создание оптимальных условий (в виде ресурсов белка и жира) для воспроизводства.

ЛИТЕРАТУРА

- Дрягин П.А. Основные направления в изучении жизненных циклов рыб. Науч.-техн. бюл. ГосНИОРХ, 1961, № 13/14, 113-117.
Карзинкин Г.С., Вельтищева И.Ф., Богомоленская М.П. К изучению интенсив-

- ности включения C^{14} в органические вещества икры и молоди осетра (*Acipenser guldenstadti* Brandt). *Вопр. ихтиол.*, 1970, 10, 103-108.
- Крыжановский С.Г. Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб (Cyprinidae и Siluridae) // *Тр. ин-т морфол. животных АН СССР*, 1949, вып. 1, 5-332
- Липская Н.Я., Чекунова В.И., Шатуновский М.И. Годовые балансы вещества и энергии у салаки и трески Балтики В кн.: *Материалы симпозиума «Экосистемы Балтики»* Гдыня, 1975, 26.
- Никольский Г.В. Теория динамики стада рыб. М.: Наука, 1965. 447 с.
- Новиков Г.Г. Рост и энергетика развития костистых рыб в раннем онтогенезе. М.: Эдиториал УРСС, 2000. 295 с.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.
- Персов Г.М. Дифференцировка пола и становление индивидуальной плодовитости у рыб. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Л., 1969.
- Поленов А.Л. Гипоталамический контроль процессов размножения у рыб // *Тр. ВНИРО*, 1975, 111, 54-69.
- Расс Т.С. О периодах жизни и закономерностях развития и роста у рыб // *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, 1948, 3, 295-305.
- Рыжков Л.П. Морфофизиологические закономерности и трансформация вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб. Петрозаводск: Карелия, 1976. 288 с.
- Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. М.: Изд-во АН СССР, 1939. 139 с.
- Христофоров О.Л. Изменения в состоянии гонад и гипофиза сайки *Boreogadus saida* Lerechin, связанные со старением // *Тр. ВНИРО*, 1975, 115, 160-171.
- Шатуновский М.И., Богоявленская М.П., Шевченко В.В. Методы анализа липидов рыб. В кн.: *Методика морфофизиологических и биохимических исследований рыб*. М., 1972. 51-62.
- Шатуновский М.И., Богоявленская М.П., Вельтищева И.Ф., Масленникова Н.В. Исследования генеративного обмена балтийской трески // *Тр. ВНИРО*, 1975, 96, 57-62.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука, 1980. 282 с.
- Шатуновский М.И., Белянина Т.Н. Созревание и плодовитость рыб в пределах поколений в связи с их физиологической неоднородностью. В кн.: *Обмен веществ и биохимия рыб*. М.: Наука, 1967. 38-44.
- Daan N. Consumption and production in North Sea cod *Gadus morhua*. An assessment of the ecological status of the stock // *Neth. J. Sea Res.*, 1975, 9 (1), 24-55

- Hatanaka, Kosaka M., Sato G.* Growth and food consumption in plaice Pt I. *Limanda yokohamae* (Günther) // Tohoku J. Agr. Res., 1956a, 7, 151-162
- Hatanaka, Kosaka M., Sato G.* Growth and food consumption in plaice. Pt II *Kareius bicoloratus* (Basilewsky) // Tohoku J. Agr. Res., 1956b, 7, 163-174.
- Lasker R.* Utilization of zooplankton energy by a pacific sardine population in the Californian current // Symp. Food Chain Stud., 1970, 4, 265-284.

ОСОБЕННОСТИ СТАНОВЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ КОСТИСТЫХ РЫБ

Биологический факультет МГУ, Москва

Как известно, клеточное дыхание - это последовательность реакций, с помощью которых организм использует энергию связей органических молекул для синтеза макроэргических соединений типа АТФ. Наличие кислорода является одним из необходимых условий протекания процессов аэробного обмена. Ставшие классическими расчеты Крога (Krogh, 1941) показали, что нормально метаболизирующая клетка, лишенная специальных систем подачи кислорода, может быть обеспечена кислородом только в том случае, если ее диаметр не превышает 1 мм. Именно поэтому все высокоорганизованные животные имеют чрезвычайно разветвленную систему транспорта кислорода, пронизывающую все органы и ткани.

Обитание в водной среде с точки зрения дыхания является весьма проблематичным. Содержание кислорода, при равных условиях, в воде гораздо ниже, чем в воздухе. Так, например, при 10⁰С и нормальном атмосферном давлении в 1 литре воды содержится в 26 раз меньше кислорода, чем в 1 литре воздуха. Кроме того, содержание кислорода в воде подвержено сильной зависимости от температуры и солености. Так, при увеличении температуры от 0 до 30⁰С содержание кислорода при 100% насыщения снижается в 2 раза, в морской воде содержится кислорода на 20% меньше, чем в пресной (Кляшторин, 1982; Holeton, 1980). Известно также, что в силу целого ряда причин колебания насыщения воды кислородом в природных водоемах очень значительны (от 0 до 130%) (Никольский, 1963; Holeton, 1980).

Таким образом, в эмбрионально-личиночном развитии, когда только происходит становление дыхательной функции, рыбы сталкиваются со значительными трудностями, что привело к формированию различного рода дыхательных приспособлений.

Эволюция адаптаций к кислородным условиям развития проходила по двум основным направлениям (Соин, 1968). эмбриональные

приспособления, обеспечивающие возможность развития при благоприятных условиях дыхания, и эмбриональные приспособления, способствующие более эффективному извлечению кислорода из воды, особенно при низких его концентрациях.

Первое направление - это структурные особенности строения икры, связанные: а) с развитием в пелагиали - уменьшение удельного веса икры посредством увеличения перивителлинового пространства, обводнения желтка, включения жировых капель и т.д.; б) с развитием на быстром течении - различные способы прикрепления икры к подводным предметам, в) с развитием в гнездах на или над поверхностью воды. В этих случаях зародыши и личинки развиваются в условиях высокого кислородного насыщения, провизорных дыхательных органов они, как правило, не имеют. Из приспособлений, облегчающих потребление кислорода, у них имеется только нервно-мышечная моторика, она же является единственным компенсаторным механизмом при некотором снижении содержания кислорода в воде (Резниченко, 1982). Форменные элементы крови, содержащие гемоглобин, у таких зародышей появляются значительно позже, чем происходит закладка сосудов и образуется плазма (Пестова, 1955; Крыжановский, 1956; John, 1932), обычно это происходит уже после вылупления.

Второе направление - это адаптации, способствующие более эффективному получению кислорода из воды. Зародыши, развивающиеся в условиях пониженных концентраций кислорода (или флуктуаций), имеют сложную систему дыхательных приспособлений. До перехода к жаберному дыханию происходит последовательная смена ряда механизмов и приспособлений, способствующих облегчению доступа кислорода к тканям. Так, например, протоплазматическая моторика сменяется нервно-мышечной (движения тела, подвижность грудных плавников и жаберно-челюстного аппарата), клетки крови и гемоглобин появляются практически одновременно с формированием сердца и сосудов, сильное развитие получает провизорный орган дыхания - сосудистая сеть. Такая сосудистая система, имея одинаковое назначение, может иметь различную локализацию и формироваться у представителей различных систематических групп разными сосудами (Соин, 1968; Черняев, 1982).

- 1) на желточном мешке - подкишечная, печеночная вены, кювьеровы протоки,
- 2) в спинной плавниковой складке - сегментальные сосуды;
- 3) в анальной плавниковой складке - хвостовая вена;
- 4) в преданальной складке - подкишечная вена;
- 5) в грудных плавниках - подключичная артерия;
- 6) в наружных жабрах - висцеральные сосуды;
- 7) в жаберной крышке и псевдобранхии - мандибулярная и гноидная дуги аорты;
- 8) на перикардии - кювьеровы протоки;
- 9) в собственно теле зародыша - сегментальные сосуды;
- 10) в хвостовой лопасти - производные сегментальных сосудов.

Таким образом, мы видим, что до перехода к жаберному дыханию у зародышей, развивающихся в условиях слабой проточности, низкого содержания кислорода или его флюктуаций, имеются специальные органы дыхания, в отличие от дефинитивных (жабры), различающиеся строением, но выполняющие одинаковую функцию.

Степень развития эмбриональных органов дыхания находится в прямой зависимости от кислородных условий среды и интенсивности развития организма. Наибольшего развития сосудистая сеть достигает у зародышей живородящих рыб в связи с инкубацией в полости тела, но и здесь есть различия: зародыши северных видов имеют менее развитые органы дыхания, чем представители тропических вод, что связано с повышенным содержанием кислорода в воде и меньшей интенсивности развития (Гулидов, 1963).

При развитии в экспериментальных условиях при различной степени насыщенности воды кислородом результаты аналогичны наблюдаемым в природе: плотность сосудистой сети, ширина сосудов может варьировать в зависимости от кислородных условий - усиливается при инкубации в воде с пониженным содержанием кислорода и развиваться слабее при высоких его концентрациях (Васильев, 1957; Юровицкий, Резниченко, 1961; Бузников, 1964). Интересно отметить, что в эксперименте высокие концентрации кислорода вызывают не только задержку образования гемоглобина, но даже и его полное отсутствие (Гулидов, 1970, 1974; Гулидов, Попова, 1977; Резниченко, 1982). Аналогом подобной ситуации в природе являются белокровные

антарктические виды.

Развитие дыхательных органов непосредственно связано с особенностями энергетики организма и проявляется на фоне ограниченных эндогенных ресурсов. В ряде экспериментальных работ было показано, что при развитии в условиях пониженного содержания кислорода в воде вылупляются более мелкие эмбрионы с меньшим остатком желтка, чем при инкубации в условиях 100% насыщения (Васильев, 1957; Юровицкий, Резниченко, 1963). То есть адаптация к неблагоприятным условиям проходит с затратами энергии, что приводит к снижению прироста. Рациональное расходование энергии в раннем онтогенезе очень важно в связи с необходимостью достижения организмом определенной степени дифференцировки и определенных размеров к тому моменту, когда он сможет перейти на питание внешней пищей: более крупные предличинки и личинки имеют гораздо большие возможности при потреблении более крупных кормов, увеличении темпа роста и выживаемости. Таким образом, мы видим насколько важно для рыб в раннем развитии поддержание необходимого уровня дыхания и насколько многообразны приспособления, имеющие и морфологический, и физиологический, и поведенческий характер.

Важность проблемы и большое количество исследований породили, естественно, и ряд подходов к анализу полученных результатов. Это и представления, связанные с теорией критических периодов, и с периодизацией развития (Рыжков, 1976). Большое внимание уделялось также оценке преобладающего влияния на динамику потребления кислорода смены механизмов дыхания (Безлер, 1932, 1939; Олифан, 1939, Привольнев, 1939, Черняев, 1982). В соответствии с другой точкой зрения - особенности развития дыхательной функции никак не сказываются на энергетическом обмене в раннем онтогенезе, а определяются процессами роста (Hayes et al., 1951; Нейфах, 1960; Никольская, 1965).

Проведенные позднее исследования дыхания зародышей и личинок рыб, в комплексе с работами по изучению особенностей роста и резорбции запасных веществ в раннем онтогенезе (Зайцева, 1985; Куфтина, 1985) показали правомерность обеих точек зрения (Строганов, 1987; Новиков, Строганов, 1990). Потребление кислорода, как комплексный показатель энергетического обмена, отражает сумму процес-

сов и перестроек, происходящих в быстро развивающемся организме

При этом, вне зависимости от принадлежности к экологической группе, общий характер динамики потребления кислорода определяется интенсивностью и масштабами роста тела зародыша (рис. 1). Скорость потребления кислорода у представителей пелагофильной группы (треска, белый амур, толстолобик) во время развития под оболочкой увеличивается постоянно и равномерно (Соловьев, Толчинский, 1970; Davenport, Lanning, 1980). Только у трески в момент становления сердечной активности наблюдается небольшое отклонение от равномерного нарастания потребления кислорода. Зародыши пелагофилов, как правило, имеющие мелкие размеры и развивающиеся при постоянно высоких концентрациях кислорода в мощно развитых провизорных органах дыхания (сосудистая система) не нуждаются; клетки крови и гемоглобин у них образуются уже после вылупления (рис. 2). Механизмы, облегчающие доставку кислорода к тканям, развиты слабо. В связи с чем, у пелагофилов во время зародышевого развития характер изменения потребления кислорода наиболее близок к характеру изменения массы тела зародыша (Строганов, 1987).

В отличие от пелагофилов, динамика потребления кислорода в эмбриональном развитии представителей литофильной группы (семга, радужная форель, пинагор) имеет более сложный характер (Строганов, Новиков, 1990; Новиков, Строганов, 1990; Новиков, Строганов, 1992) (рис. 1). Наблюдающиеся отклонения от экспоненциальной зависимости связаны с особенностями становления дыхательной функции (развитие моторик, увеличение количества клеток крови, их дифференцировка, синтез гемоглобина, развитием сосудистой сети на желточном мешке, изменение подвижности и др.). При этом, как правило, не удастся выделить изменения в потреблении кислорода, обусловленные развитием какой-то одной из моторик (или структуры), что связано с постепенностью и преемственностью развития этих механизмов (Дорн, 1937; Резниченко, 1982), перекрыванием их во времени (Klinkhardt et al., 1987) (рис. 2). Реализация принципов преемственности и замещаемости позволяет литофилам в условиях пониженного или флюктуирующего насыщения воды кислородом на фоне развития одних механизмов и прекращения работы других поддерживать необходимый уровень дыхания. При повышении температуры (даже до значений, с

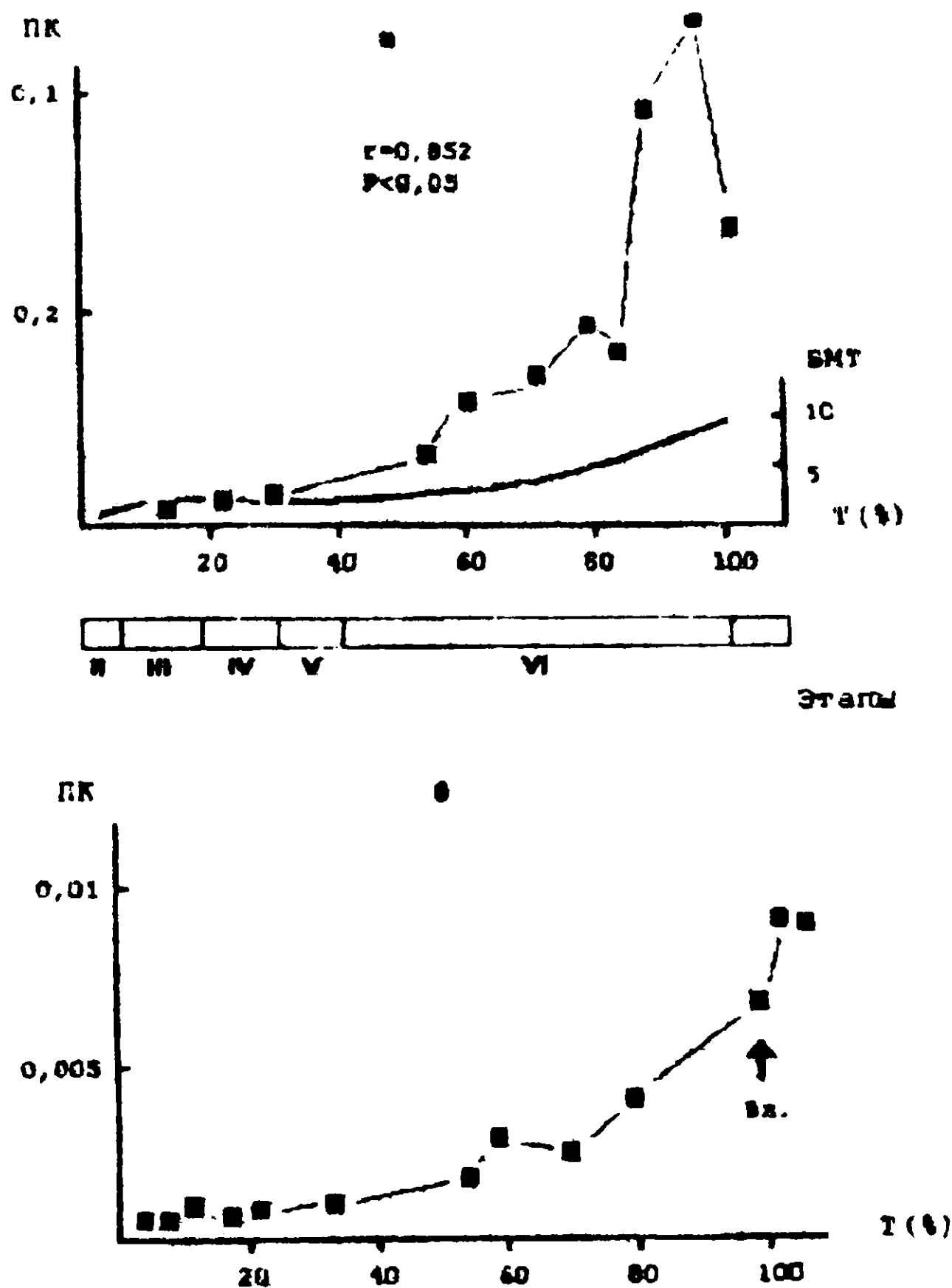


Рис 1 Потребление кислорода в эмбрионально-личиночном развитии костистых рыб: а - пинагор (Строганов, 1987); б - треска (Davenport, Lonning, 1980). ■ - потребление кислорода (ПК) мл O₂ / 100 экз. / час. — - белковая масса тела (БМТ) мг / 100 экз.

которыми этот вид в эмбрионально-личиночном развитии не сталкивается) до уровня, когда содержание кислорода падает, а обменные процессы резко возрастают, все же кислород не становится лимитирующим фактором. Таким образом, интенсивное развитие эмбриональных дыхательных приспособлений позволяет при культивировании (напри-

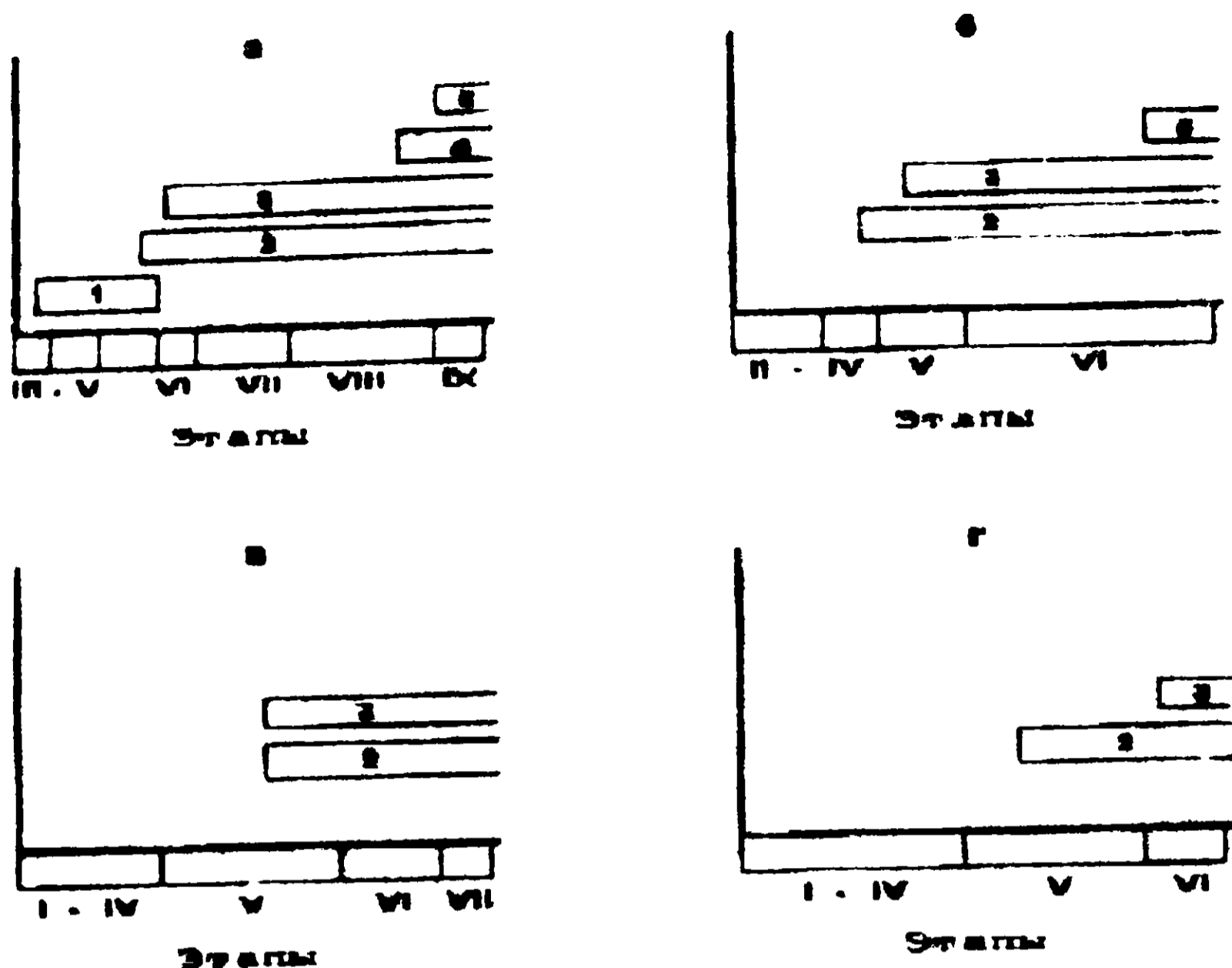


Рис.2. Эмбриональная моторика литофилов и пелагофилов. а - семга, радужная форель; б - пинагор; в - треска; г - белый амур, толстолобик 1 - цитоплазматическая моторика; 2 - подвижность тела зародыша, 3 - пульсация сердца; 4 - подвижность грудных плавников; 5 - подвижность жаберно-челюстного аппарата.

мер, таких хозяйственно ценных видов, как семга и радужная форель) использовать повышенные температурные режимы.

Дыхательные эмбриоадаптации имеют крайне важное значение для существования вида и связано это прежде всего с тем, что, в отличие от взрослых форм, зародыши не в состоянии определять свое местообитание. Именно это обстоятельство привело к формированию большого спектра дыхательных эмбриональных приспособлений. О важности этих приспособлений свидетельствует также и тот факт, что зародыши и личинки могут достигать в этой сфере гораздо большего прогресса, чем взрослые формы. Хорошим примером являются осетрообразные. Неблагоприятные кислородные условия развития (среди по-

лузаиленных камней и гальки) вызвали у их зародышей формирование сосудистой сети не только желточного мешка, но и жаберных крышек, спинной и хвостовой плавниковых лопастей, появление наружных жабр (Соин, 1968). Такого развития дыхательных приспособлений нет даже у зародышей высших костистых рыб. Напротив, для взрослых особей осетрообразных кислород является лимитирующим фактором (Кляшторин, 1982) в силу особенностей морфологии висцерального скелета (Суворов, 1948) и неспособности жаберного аппарата осетрообразных (в отличие от жаберного аппарата высших костистых рыб, например, карпообразных) осуществлять эффективное потребление кислорода в условиях его дефицита. Даже имеющее компенсаторный характер, значительно более высокое, чем у высших костистых рыб, содержание гемоглобина в крови (Коржуев, 1963), не исправляет ситуацию. Несвершенство строения жаберного аппарата, видимо, определили и узость занимаемой осетрообразными экологической ниши, и крайне низкое число видов.

Таким образом, эмбриональные дыхательные приспособления костистых рыб способствуют освоению широкого спектра водоемов, различающихся кислородным режимом. Образование провизорных дыхательных структур в силу определенной энергоемкости хотя и снижает эффективность использования зародышами запасных питательных веществ, но позволяет выдерживать присущие водной среде колебания содержания кислорода в значительных пределах. Вся совокупность эмбриональных дыхательных приспособлений, включая и различного типа моторики, развивается и функционирует по определенным закономерностям в соответствии с принципами преемственности и замещаемости. Причем дыхательные приспособления зародышей, как это ни парадоксально, могут достигать даже большего совершенства (с точки зрения эффективности), чем органы дыхания взрослых организмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Безлер Ф.И. К вопросу о потреблении кислорода личинками леща и карася // Труды лимнол. станции в Косине. 1932. вып. 5, 125-146.
- Безлер Ф.И. О дыхании личинок верховки // Докл. АН СССР. 1939. 23, 102-106.
- Бузников Г.А. Зависимость некоторых физиологических процессов в эмбрио-

- генезе костистых рыб от кислородного режима // Проблемы современной эмбриологии. М., 1964. 251-257.
- Васильев И.С. О кислородном режиме при искусственном разведении лососей // Рыбное хозяйство 1957. №9, 56-62
- Гулидов М.В. Органы дыхания зародышей живородящих костистых рыб // Вопр. ихтиол., 1963, 3, 288-303.
- Гулидов М.В. Морфо-физиологические особенности развития рыб при различных кислородных условиях инкубации // Автореф. дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ, 1970.
- Гулидов М.В. Влияние различных кислородных условий инкубации на выживание и некоторые особенности развития верховки *Leucaspis delineatus* (Неск.) в эмбриональный период жизни // Вопр. ихтиол. 1974. 14. 454-459.
- Гулидов М.В. Попова К.С. Влияние повышенных концентраций кислорода на выживание, ход вылупления зародышей леща *Abramis brama* (L.) // Вопр. ихтиол. 1977. 17. 188-191.
- Дорн А. Принцип смены функций. М.-Л.: Биомедгиз. 1937. 195 с.
- Зайцева И.И. Влияние температуры и солености на рост и использование запасных веществ желтка в раннем онтогенезе некоторых лососевых рыб // Дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ. 1985 177 с.
- Кляшторин Л.Б. Водное дыхание и кислородные потребности рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. 168с.
- Коржуев П.А. Физиолого-биохимическая характеристика крови производителей осетровых рыб. В кн.: Осетровое хозяйство в водоемах СССР М. 1963, 69-73.
- Крыжановский С.Г. Материалы по развитию сельдевых рыб. Труды Института морфол. животных АН СССР. 1956. вып. 17, 253 с.
- Куфтина Н.Д. Влияние температурного фактора на некоторые особенности роста и обменных процессов в эмбриогенезе рыб с разной спецификой развития. Дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ. 1985, 208с.
- Нейфах А.А. Радиационная инаktivация клеточных ядер как метод исследования их роли в развитии дыхания у зародышей рыб // Биохимия, 1960. 25, 658-668.
- Никольская И.С. Потребление кислорода развивающимися зародышами невского лосося *Salmo salar* L. в процессе развития // Вопр. ихтиол. 1965, 5, 742-747.
- Никольский Г.В. Экология рыб. М.: Высш. школа. 1963, 367с.
- Новиков Г.Г., Строганов А.Н. Потребление кислорода в раннем онтогенезе некоторых лососевых рыб. (Биол. науки), Деп. ВИНТИ № 4428-В90. М.: 1990. 1-19.

- Новиков Г.Г., Строганов А.Н. Об экологических методах управления развитием и принципах создания биотехнологий искусственного воспроизводства костистых рыб // Рыбное хозяйство. сер. Аквакультура, информ. пакет ВНИЭРХ. 1992, вып.1, 11-30.
- Олифан В.И. Экспериментальные эколого-физиологические наблюдения над икрой и личинками севрюги, леща и волжской сельди // Зоол журн. 1939. 18, 470-471.
- Пестова И.М. Образование эритроцитов в раннем онтогенезе костистых рыб в связи с условиями их развития // Докл. АН СССР. 1955. 101, 165-167.
- Привольнев Т.И. Дыхание икры весенненерестующих рыб и его значение в разработке методики рыборазведения // Изв. ВНИОРХ. 1939. 21, 143-156.
- Резниченко П.Н. Преобразование и смена механизмов функций в онтогенезе низших позвоночных животных. М.: Наука. 1982, 216 с.
- Рыжков Л.П. Морфофизиологические закономерности и трансформация вещества и энергии в раннем онтогенезе пресноводных лососевых рыб. Петрозаводск: Карелия. 1976, 288 с.
- Соин С.Г. Приспособительные особенности развития рыб. М.: МГУ. 1968, 89 с.
- Соловьев Л.Г., Толчинский Г.И. Наблюдение кислородных условий инкубации икры рыб с помощью полярографа // Вопр. ихтиол. 1970. 10, 915-916.
- Строганов А.Н. Закономерности изменения потребления кислорода и особенности энергетического обмена у некоторых видов рыб на ранних этапах онтогенеза при различных значениях абиотических факторов // Дисс. канд. биол. наук. М.: МГУ. 1987, 189с.
- Строганов А.Н., Новиков Г.Г. Особенности дыхания эмбрионов пинагора при развитии икры в кладке. Биологические науки. 1990. № 12, 45-50.
- Суворов Е.К. Основы ихтиологии. М.: Советская наука. 1948, 576с.
- Черняев Ж.А. Воспроизводство байкальского омуля. М.: Легкая и пищ. пром. 1982, 128 с.
- Юровицкий Ю.Г., Резниченко П.Н. О некоторых особенностях развития курина осетра (*Acipenser guldenstadti*) в условиях различного кислородного режима // Вопр. ихтиол. 1961. 1, 314-320.
- Юровицкий Ю.Г., Резниченко П.Н. Морфо-физиологические особенности зародышей осетра в условиях разного кислородного режима. В кн.: Осетровое хозяйство в водоемах СССР. М.: 1963, 77-82.
- Davenport J., Lonning S. Oxygen uptake in developing eggs and larvae of the cod, *Gadus morhua* L. // J.Fish.Biol. 1980. 16, 249-256.
- Hayes F.R., Wilmot I.R., Livinstone D.A. The oxygen consumption of the salmon

egg in relation to development and activity // J Exp. Zool. 1951. 116, 377-395.

Holeton G.P. Oxygen as an environmental factor of fishes Environ. Physiol. Fishes Lect. NATO Adv. Study Inst., Lennoxville, 22 Aug 1979 New York, London. 1980, 7-32.

John C.C. The origin of erythrocytes in the herring (*Clupea harengus*) // Royal Society of London, ser B. 1932. 110, 112-119.

Klinkhardt M., Stroganov A., Pavlov D. Motoricity of atlantic salmon embryos (*Salmo salar* L.) at different temperatures // Aquaculture. 1987 64, 219-236.

Krogh A. Comparative physiology of respiratory mechanisms. Philadelphia: Univ. Pensilvania Press. 1941, 172 p.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ В ЭМБРИОНАЛЬНО-ЛИЧИНОЧНОМ РАЗВИТИИ ЛОСОСЯ

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва,
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Исследование динамики различных классов липидов в эмбрионально-личиночном развитии лосося *Salmo salar* теснейшим образом связано с анализом отношения зародыща (личинки) и желтка в этот период. В свою очередь эти отношения определяются стратегией использования веществ желтка у рыб различной систематической и экологической принадлежности.

У рыб с мезолецитальной икрой, характерной для карповых, вьюновых и сомовых рыб, отмечается короткий период эмбрионального развития, обеспечиваемый запасами гликогена, накопленными в период большого роста ооцита, точнее в период вителлогенеза (Мильман, Юровицкий, 1973). Роль липидов в раннем развитии у этих групп рыб невелика, поскольку содержание их не превышает 2-3% от сырой массы яйца (Kaitaranta, Ackman, 1981; Нефедова и др., 1994). Наши предыдущие исследования показали, что у вьюна *Misgurnus fossilis*, имеющего мезолецитальную икру, в процессе эмбрионального развития происходит перенос гликоген-фосфорилазного комплекса из желтка в зародыш. Этот комплекс, представляющий собою частицы высокомолекулярного гликогена, организованного в гликогеновые органеллы со встроенными в них ферментами синтеза и деградации гликогена, обеспечивает энергетику развивающегося зародыща (Мильман, Юровицкий, 1973). У рыб с полилецитальной икрой, к которым относятся лососевые рыбы, наблюдается продолжительный период эмбрионального развития и высокий уровень дифференциации к моменту вылупления. Ранний онтогенез этих рыб обеспечивается высоким содержанием липидов, достигающим 10-12% от сырой массы яйца (Coweу et al., 1985; Нефедова и др., 1994). Как показали наши исследования, в ходе эмбрионального развития лосося *Salmo salar* происходит интенсивное уменьшение массы желтка. На этапе гаструляции масса желтка

составляет более 80% от его массы на этапе хвостовой почки. На этапе пигментации глаз масса желтка составляет 15,8% от его массы на этапе хвостовой почки. Синхронно с уменьшением массы желтка происходит снижение содержания общих липидов с 6,5-7,3 мг на этапе дробления до 3,7-4,3 мг у 4-суточной личинки в расчете на один зародыш (личинку), т.е. на 36%. При сравнении динамики липидных фракций в зародышах и личинках лосося с их динамикой в желтке показано, что в желтке эти соединения имеют устойчивую тенденцию к снижению особенно в личиночном развитии (Сидоров и др., 1996).

В желтке содержание фосфолипидов - доминирующего класса липидов, который является основным компонентом для синтеза мембран, снижается от этапа дробления до 4-суточной личинки в 1,6 раза (табл. 1). Содержание холестерина, участвующего в этих процессах снижается в 6 раз. За этот же период уровень триацилглицеринов, обеспечивающих энергетику зародыша, снижается в 2,6 раза.

Таблица 1.

Содержание липидов в желтке лосося, мг на один желток

Стадии развития	Фосфолипиды	Триацилглицерины	Холестерин
Дробление	5,0±0,3	1,3±0,05	0,4±0,05
Гастрюляция	3,7±0,3	0,8±0,04	0,2±0,03
Хвостовая почка	4,2±0,1	0,6±0,04	0,1±0,03
Пигментация глаз	3,7±0,2	0,5±0,06	0,1±0,02
Личинка 4-сут	3,1±0,1	0,5±0,04	0,07±0,005

Исследование динамики фосфолипидных фракций желтка показало, что основной фосфолипид - фосфатидилхолин (ФХ), содержание которого на этапе дробления достигает 81% от общих фосфолипидов, ко времени вылупления зародыша из оболочки уменьшается в 2,5 раза, следующий по содержанию фосфолипид - фосфатидилэтаноламин (ФЭА) - снижается в 3 раза (табл. 2). Что касается минорных фосфолипидов желтка - лизофосфатидилхолина (лизоФХ), сфингомиелина, фосфатидной кислоты и кардиолипина, то за это время происходит увеличение их содержания. В частности, уровень лизоФХ повышается в 3 раза. Этот фосфолипид является сильным детергентом и значительное повышение его уровня свидетельствует о его участии в гидролитических процессах в желтке. Это соображение подкрепляется фак-

Таблица 2

Содержание фосфолипидов в желтке лосося, мг на один желток

Стадии развития	ФХ	ФЭА	лизоФХ
Дробление	$4,0 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,04$	0,0
Гаструляция	$2,9 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,005$
Хвостовая почка	$3,4 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01$
Пигментация глаз	$2,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,03$
Личинка 4-сут	$1,6 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,06$	$0,3 \pm 0,05$

том отсутствия роста уровня лизоФХ в теле зародыша (личинки).

За исследованный период развития содержание фосфолипидов в желтке снижается на 38%. За это же время их содержание в целом организме повышается на 32%. При этом уровень ФХ, основной фосфолипидной фракции в желтке, непрерывно снижается в отличие от этого процесса в целом зародыше. Что касается липидной фракции, обеспечивающей энергетiku развивающегося организма - триацилглицеринов (ТАГ), то в целом зародыше за исследованный период ТАГ расходуются на 40%, а в желтке - на 61% (табл. 1). Жировые капли желточного мешка на этапе дробления на 94,6% состоят из ТАГ (табл. 3). Около половины содержимого жировой капли у 4-суточной личинки расходуется на энергетические нужды, а другая половина остается неиспользованной до поздних этапов личиночного развития, выполняя гидростатическую функцию до появления плавательного пузыря.

Таблица 3.

Содержание липидов в жировых каплях желтка лосося, % от общих липидов

Стадии развития	Фосфолипиды	Триацилглицерины	Холестерин
Дробление	1,8	94,6	1,8
Гаструляция	12,9	79,3	следы
Хвостовая почка	14,6	75,0	2,4
Пигментация глаз	22,0	67,9	следы
Личинка 4-сут	28,0	59,0	0,7

В процессе эмбрионально-личиночного развития соотношение связанных жирных кислот в ФХ и ТАГ зародыша и желтка существенно меняется. В желтке в это время происходит снижение насыщенных жирных кислот, в основном пальмитиновой (16:0) кислоты. В то же

время содержание этого соединения существенно увеличивается в зародыше, особенно к личиночному периоду развития. Эти изменения сопровождаются снижением уровня ФХ в желтке. Дело в том, что насыщенные жирные кислоты являются более предпочтительным субстратом для дыхания, чем ненасыщенные жирные кислоты.

К моменту вылупления личинки из оболочки наибольшее снижение содержания жирных кислот в ФХ и ТАГ желтка и жировых капель было отмечено для полиеновых кислот, в частности, для докозагексаеновой (22:6 ω 3) кислоты, которое коррелировало с подъемом их содержания в теле личинки. Сразу после вылупления активируются процессы гидролиза липидов в желтке, синхронизированные со значительным ростом уровня лизоФХ, которые обеспечивают освобождение докозагексаеновой кислоты и поступление ее в тело личинки.

Таким образом, в процессе эмбрионально-личиночного развития лосося происходит перераспределение веществ между зародышем (личинкой) и желтком. Утилизация фосфолипидов, происходит в основном на ранних этапах развития, а триацилглицеринов, энергетического материала - происходит в основном после вылупления зародыша из оболочки. На ранних этапах развития наблюдается избирательное использование липидов желтка, обогащенных насыщенными жирными кислотами, а к моменту вылупления из оболочки избирательно используются липиды, обогащенные полиеновыми кислотами.

ЛИТЕРАТУРА

- Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г. Механизмы энзиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе. М.: Наука. 1973. 235 с.
- Нефедова З.А., Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г. Липидный состав зрелых яиц костистых рыб // Онтогенез. 1994. 25, 53-59.
- Сидоров В.С., Нефедова З.А., Юровицкий Ю.Г. Динамика фракционного состава липидов в желтке и жировых каплях в онтогенезе лосося // Онтогенез. 1996. 27, 200-203.
- Юровицкий Ю.Г., Нефедова З.А., Сидоров В.С. Динамика содержания липидов в эмбриональном и личиночном развитии лосося // Онтогенез. 1996. 27, 89-94.
- Cowey C.B., Bell J.G., Knox D. Lipids and lipid antioxidant systems in developing eggs of Salmon // Lipids. 1985. 20, 567-572.
- Kaltranta J.K., Ackman R.G. Total lipid and classes of fish roe // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1981. 69, 725-729.

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ЛЕЩА
НАКАНУНЕ НЕРЕСТА

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

Имеющаяся обширная литература по изменчивости электрофоретических спектров белков крови рыб в период полового созревания затрагивает, в основном, вопросы появления новых белков (вителлин, FS-3-белок) и изменения в количественном соотношении белковых фракций (Адамова, Новиков, 1973; Kishida Mitsuyo, Specker Jennifer, 1994; Silversand Shrister et al, 1993; Кирсипуу, Лаутасте, 1979; Joshi, 1989). Что касается вителлина, то на сегодняшний день этот белок достаточно хорошо изучен у различных видов рыб вплоть до аминокислотной последовательности и последовательности нуклеотидов в ДНК (Mouchel Nathalia et al, 1996). Структура имеющего биологическую активность С-реактивного белка и лектина FS-3-белка, обнаруженного у самок *Sebastes taczanowskii*, также активно исследуется (Takemura Akihiro et al, 1993). Изменчивость количественных соотношений фракций белков хорошо изучена на разных видах рыб. Затруднения возникают при использовании в анализе динамики какой-либо фракции электрофоретических методов с высоким разрешением, так как при этом число фракций увеличивается, а сами фракции изменяются не только количественно, но и по электрофоретической подвижности R_f , молекулярной массе и ряду других физико-химических параметров. При использовании методов с низким разрешением затруднений, как правило, не возникает, так как приходится иметь дело с небольшим количеством фракций. Из вышесказанного следует выделить еще один аспект в изменчивости электрофоретических спектров белков крови рыб, связанный с оварияльным циклом, а именно - качественную перестройку фракций, перегруппировку составляющих их компонентов.

Целью данного исследования является выяснение характера и возможных причин изменчивости электрофоретической подвижности некоторых белков сыворотки крови леща, а именно - альбуминов и α_1 -глобулинов накануне нереста. Результаты исследования основаны

на предварительной работе по физико-химической идентификации основных групп белков крови разных видов рыб.

Материалы и методы

В основу работы положены результаты изучения белков крови леща (*Abramis brama* L.). В работе использовались половозрелые особи. У всех исследованных рыб (в общей сложности 204 экземпляра) определяли вес, длину и стадию зрелости гонад.

Для альбуминов и α_1 -глобулинов определяли следующие структурно-функциональные характеристики: электрофоретическую подвижность (R_f); величины молекулярной массы (ММ) нативных белков и их субъединиц; наличие в структуре молекулы ковалентно связанного с белком углевода; центров специфического или неспецифического связывания альбуминспецифичного красителя бромкрезолового пурпурного (БКП) и некоторых других красителей, таких как синьки Эванса (СЭ) и бромфенолового синего (БФС), способности к связыванию белками железосодержащих лигандов - гемоглобина, гемина и Fe^{3+} ; выявление в составе белков липидного и углеводного компонентов и определение устойчивости липо- и гликопротеидных комплексов.

Пробы крови у крупных рыб отбирали из жаберных сосудов, у мелких - из хвостовых сосудов. Кровь собирали в пробирки. Отстоявшуюся сыворотку использовали в работе в течение 1-2 суток. Сыворотку хранили в холодильнике при 4°C. Из электрофоретических методов использовали диск-электрофорез (Davis, 1964; Ornstein, 1964), электрофорез в градиенте концентраций полиакриламидного геля (ПААГ) (Koppershlander et al., 1969), и SDS-электрофорез (Weber, Osborn, 1969; Laemmli, 1970). После электрофореза проводили специфическое и неспецифическое окрашивание белков красителями, выявляющими различные функциональные группы (Гааль и др., 1982). Величины ММ нативных белков определяли в градиенте ПААГ. ММ субъединиц, связанных в белке нековалентно или с помощью S-S-мостиков, определяли в SDS-электрофорезе. В качестве свидетелей использовали набор белков с известной ММ: бычий сывороточный альбумин (67 кД), овальбумин (45 кД), цитохром с (12 кД), тропонины Т, I и С (38 кД, 24 кД и 18.5 кД соответственно). SDS-электрофорез применяли и при

определении ММ белкового компонента в нековалентных комплексах белка с углеводами и липидами. Характер связи - ковалентный или нековалентный - определяли обработкой комплекса денатурирующей смесью (мочевина, SDS, β -меркаптоэтанол) и последующим сравнением величин ММ и окрашивания на лиганд (углевод) до и после обработки. Взаимодействие белков с лигандами (красителями и геминном) контролировали спектрофотометрически и электрофоретически.

Необходимо отметить, что в зависимости от поставленной задачи при проведении электрофореза количество вносимого белка варьировало. Так, при проведении SDS-электрофореза вносили, как правило, не более 9-10 мкг белка на трубку (лунку), а в случае диск-электрофореза количество вносимого белка варьировало довольно существенно, так как для демонстрации, к примеру, полиморфного локуса В альбуминов, требовалось больше сыворотки, чем для исследования физико-химических параметров белка сыворотки "челнока". Поэтому в одном случае белка вносили больше (до 100 мкг на лунку), в другом случае меньше (20 мкг белка на лунку). В связи с этим локусы, не интересовавшие нас, были, естественно, перегружены белком, что сказывалось на общем виде электрофореграммы, ухудшая качество информативной ее части. Поэтому для удобства восприятия информативные участки на электрофореграммах выделены либо фигурными скобками, либо стрелками (рис. 1, 2, 6). Для количественного определения белка использовали, в основном, метод Лоури и экспресс-метод с Кумасси G-250 (Lowry et al, 1951; Spector, 1978).

Результаты

Рассмотрим в общих чертах структуру подверженных изменениям в овариальном цикле фракций, а именно - фракции альбуминов и α_1 -глобулинов (рис. 1). Альбумины лучше представлены в диск-электрофорезе тремя фракциями: А, В и С. Каждая фракция, в свою очередь, может состоять из 1-2 компонентов. Зачастую на электрофореграммах видны только 1-2 наиболее подвижных компонента альбуминовой системы. Это может быть связано с другим белком, который, меняя свою электрофоретическую подвижность, зачастую "маскирует" фракции альбуминов А и В. Этот белок был назван "челноком". Он является ос-

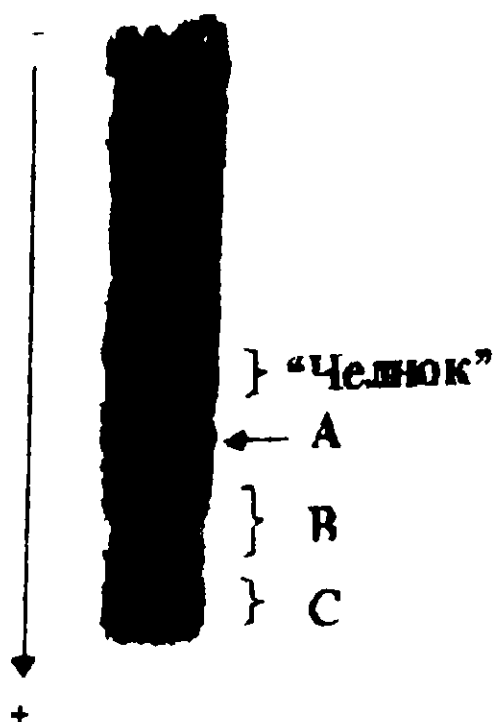


Рис 1. Диск-электрофореграмма сыворотки крови леща.

Вертикальная стрелка – направление электрофореза, + и - - анод и катод соответственно, горизонтальная стрелка и фигурные скобки указывают локусы исследуемых белков: “челнока” и альбуминов (А, В и С).

новным компонентом фракции α_1 -глобулинов (рис. 1).

Название белка отражает его способность менять электрофоретическую подвижность (от 0.5 до 0.7), а также связывать и переносить большое число лигандов (красители БКП, БФС; гемин, Fe^{3+} , углеводы, липиды). Белок “челнок” не был описан в литературе ранее, вероятно, по той причине, что его считался артефактом из-за изменчивости параметра R_f и размытости контуров на электрофореграмме (рис. 2). Для доказательства того, что изменчивость R_f и очертаний “челнока” является свойством этого белка, а не артефактом, мы использовали различные количества вносимого белка - заведомо избыточное (100 мкг на лунку) и стандартное (20 мкг на лунку). Результаты показали (рис. 2), что на полосках геля, перегруженных белком, “челнок” имеет характерный “хвост”. На электрофореграммах со стандартным количеством белка форма и контуры “челнока” также значительно варьируют. Таким образом, избыток наносимого белка является только одним из возможных факторов variability формы и электрофоретической подвижности “челнока”. При устранении этого фактора и использовании небольших количеств наносимого белка можно получить ответ на вопрос, является ли variability параметров R_f и формы “челнока” на электрофореграмме функцией самого белка, а не методической погрешностью. И действительно, при нанесении одной и той же пробы сыворотки крови в несколько лунок по 20 мкг белка в каждую, мы получили константные электрофореграммы для всех сывороточных белков, кроме “челнока”. “Челнок”, в отличие от других сывороточных



Рис. 2 Диск-электрофореграммы сывороточных белков крови 9 рыб. Вертикальная стрелка - направление электрофореза, + и - - анод и катод соответственно. 1 - белок "челнок", фигурная скобка - границы зоны "челнока".

белков, имел различные очертания и небольшой разброс в значениях R_f (0.04). Минимальное значение R_f для исследованных рыб было зафиксировано на отметке 0.48, максимальное - на отметке 0.61. У всех рыб, отловленных не в канун нереста, абсолютные значения R_f "челнока" не выходили за эти границы.

Более детальное изучение "челнока" показало, что его размытые контуры на электрофореграмме определяются, по-видимому, обнаруженной углсводной составляющей Гликопротеины, как известно, могут вести себя аномально в электрофорезе, с чем связаны некоторые методические затруднения при определении их ММ (Гааль и др., 1982). Обычно для белков с необычной структурой определение ММ проводят с помощью калибровочных кривых, построенных с использованием молекулярных маркеров с теми же конформационными характеристиками. Однако, нам не известны конформационные аналоги "челнока" и по этой причине мы определяли его ММ, используя стандартный набор маркеров, а полученные величины ММ считали кажущимися, то есть несколько отклоняющимися от истинных. На двумерной электрофореграмме (рис. 3) представлена картина белков сыворотки, на которой видно, что нативный "челнок" состоит, как минимум, из двух белков с близкими значениями ММ и R_f (1 и 2)

Рассмотрев в общих чертах структуру подверженных изменениям в оварииальном цикле рыб белковых фракций, перейдем к анализу самих изменений. Основная смена компонентов сыворотки зафиксирована накануне нереста, как правило, в конце марта - начале апреля "Челнок" резко меняет R_f с 0.55 до 0.7 (рис. 4) Его ММ при этом уменьшается с 160 до 90 кД (представлены крайние в этих опытах ве-

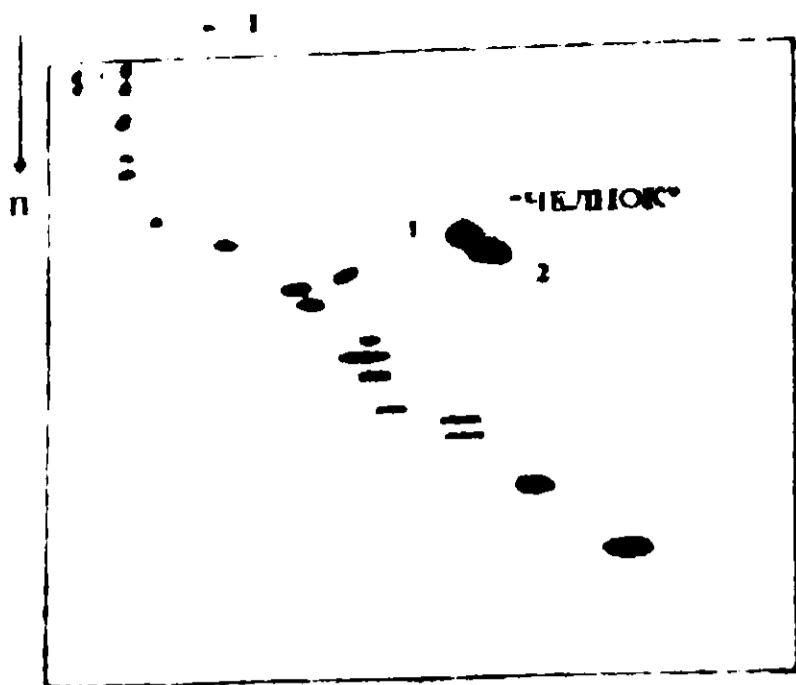


Рис. 3 Двумерный градиентный электрофорез сывороточных белков леща. Горизонтальная и вертикальная стрелки – направление диск-электрофореза (I) и градиентного электрофореза (II) соответственно. 1 и 2 – белки, входящие в состав «челнока»

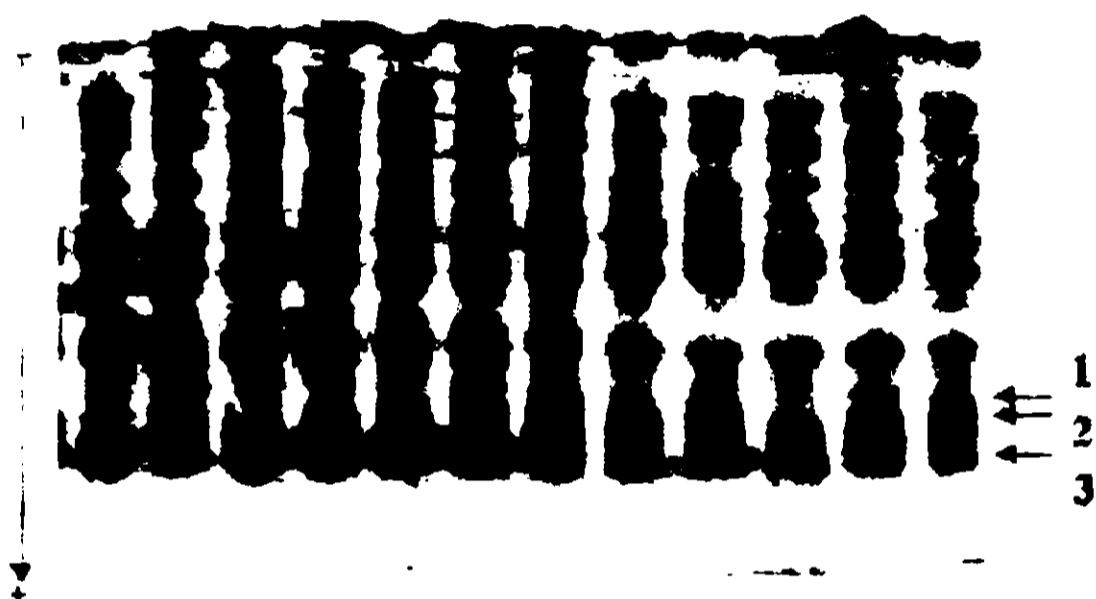


Рис. 4. Электрофорез сывороточных белков крови 12 рыб накануне нереста. Вертикальная стрелка – направление электрофореза, + и - - анод и катод соответственно. Горизонтальные стрелки – альбумины локуса С (1), «челнок» (2) и быстрый белок (3).

личины). Подвижная фракция альбуминов резко меняет R_f с 0.62-0.67 до 0.8-0.83, а ее ММ при этом меняется в сторону уменьшения (около 50 кД). Такой белок на электрофореграмме с R_f 0.8-0.83 и ММ 50 кД мы назвали «быстрым» белком (рис. 5).

Для объяснения перестановок альбуминов был проведен анализ характера изменчивости количества полос, результатом которого стало предположение о сложной структуре молекул альбумина. Анализ характера изменчивости количества полос и их электрофоретической подвижности позволил установить, что, по всей вероятности, альбуминовая система может кодироваться тремя независимыми локусами А, В и С, где продукты локусов А и С инвариантны, а продукты локуса В различаются по своей электрофоретической подвижности и числу полос (рис. 6). По характеру изменчивости мы предложили дуаллельную

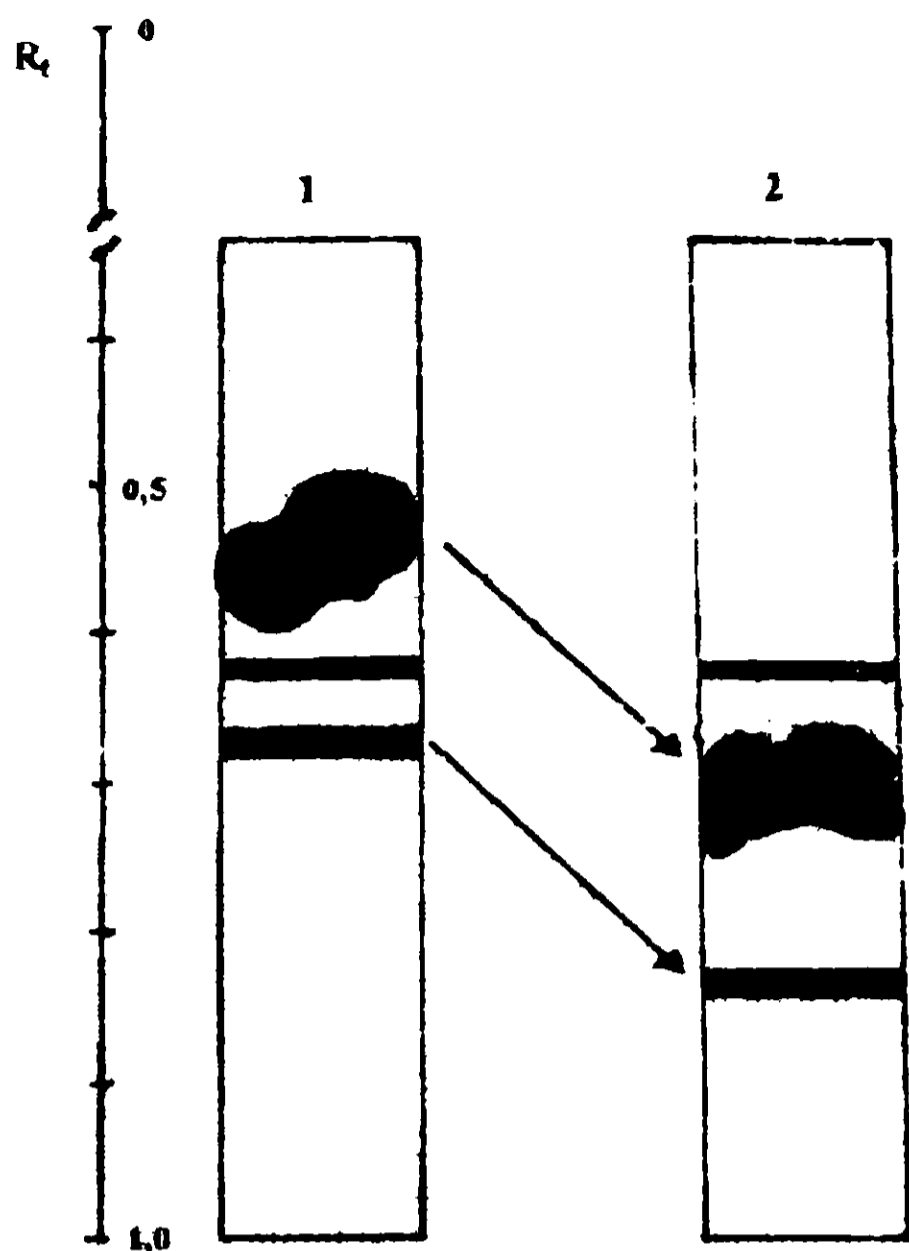


Рис. 5. Схема перемещений альбуминов и "челюнок" в крови рыб накануне нереста. Электрофорсграмма крови леща в феврале (1), и в апреле (2). Стрелки показывают изменения в подвижности "челюнка" и альбумина. Слева – шкала электрофоретической подвижности R_f .

гипотезу ген-детерминации. Стандартная проверка гипотезы по соответствию распределению Харди-Вайнберга подтвердила ее справедливость. Количество (2) и характер окрашивания полос у вероятных гетерозигот по локусу В свидетельствуют в пользу мономерной структуры альбумина, кодируемого локусом В. Однако, в случае формирования гетерозиготного спектра, на электрофореграммах наблюдается появление дополнительной полосы в зоне локуса А (рис. 1) или в зоне локуса С. Этот факт свидетельствует о возможном взаимодействии продуктов локусов А и С с продуктами локуса В, когда последний находится в гетерозиготном состоянии. По-видимому, существуют факторы, способствующие этому взаимодействию, и приводящему к формированию межлокусных гетерогенных продуктов. Такими факторами могут быть присутствующие в структуре белка ковалентно связанные с ним углеводы, а также микрогетерогенность, обусловленная наличием субъединиц. Действительно, более детальное исследование подтвердило наше предположение. Во-первых, альбумины леща имеют в своей структуре ковалентно связанный с белком углевод, а во-вторых, данные опреде-



Рис. 6 Полиморфизм альбуминов по локусу В. Фигурная скобка – границы локуса.



Рис. 7. Двумерный SDS-электрофорез сыворотки крови леща. Горизонтальная и вертикальная стрелки – направление диск (I)- и SDS (II)-электрофореза соответственно. Горизонтальный пунктир – граница Кольрауша, на которой выделены зоны гемина. Субъединицы “челюсть” обведены тонкой линией.

ления величин ММ нативных и денатурированных молекул альбуминов не противоречат выдвинутому предположению о микроструктурированности альбумина леща. Возможно, альбумин является мономером, состоящим из двух ковалентно связанных субъединиц с ММ около 50 кД каждая. Возможно также, что белок состоит из одной субъединицы с той же ММ (50 кД) и достаточно большого ковалентно связанного с белком углеводного компонента. И тот, и другой вариант объясняют факт взаимодействия продуктов разных локусов.

«Челнок» является не менее сложной структурой, чем альбумин. На двумерной SDS-электрофореграмме (рис. 7) видно, что «чел-нок» состоит из 10-13 субъединиц с ММ от 57 (самый подвижный компонент) до 73 кД (наименее подвижный компонент). В выделенной на рисунке области хорошо виден 1 макрокомпонент с ММ 67 кД. Сопоставление величин ММ нативных молекул челнока и его субъединиц позволяет предположить, что челнок состоит более, чем из двух белков с субъединичной структурой. Скорее всего, он представляет собой функциональный комплекс из белков, связанных различными межмолекулярными взаимодействиями - водородными, гидрофобными, ковалентными (через S-S-мостики). Для «челнока» характерно обнаруженное нами и у других белков крови костистых рыб свойство полифункциональности. Полифункциональность предполагает взаимодействие с множеством лигандов, о чем написано выше, а, следовательно, и возможность выполнения белком нескольких функций. Возможно, что полифункциональность «челнока» определяется суммарными физико-химическими характеристиками составляющих его белков. Но возможно также, что этим свойством обладают все белки комплекса.

Обсуждение

В свете всего вышесказанного для объяснения смены спектра белков накануне нереста мы предлагаем следующую последовательность событий: альбумины леща в преднерестовый период, когда возрастает интенсивность обменных процессов (Luskova, Lusk, 1995), в том числе и активность протеаз, ферментативным путем могут расщепляться на субъединицы с ММ около 50 кД для удобства утилизации белка. Эти субъединицы могут появляться в крови лещей в виде самостоятельного белка, который мы назвали «быстрым» белком. Дальнейший процесс утилизации альбумина предполагает деградацию «быстрого» белка до аминокислот. Считается, что при созревании гонад в тканях яичника возрастает количество свободных аминокислот и происходит это, в основном, за счет сывороточного альбумина (Mouridsen, Wallevik, 1968). Аминокислоты требуются для белкового синтеза, активно протекающего в гонадах, а также для энергетических нужд (Ким, 1974; Жукинский, Гош, 1979; Ronnestad et al, 1993). Не исключе-

но, что "быстрый" белок, имея ММ около 50 кД, что практически совпадает с ММ субъединицы альбумина, может быть звеном в цепочке расщепления альбуминов до аминокислот, требующихся накануне нереста для синтеза белка, а также использующихся и в качестве энергетического сырья.

"Челнок", вероятно, вписывается в эту схему в роли транспортного белка, что доказывается нашими исследованиями его способности связывать многие лиганды (свойство полифункциональности) и обнаружением его в интерстициальной жидкости леща (Ю.П. Чалов, личное сообщение). Сам факт обнаружения в интерстициальной жидкости белка с ММ около 150 кД можно объяснить только исходя из предлагаемой нами для "челнока" модели функционального комплекса, работающего на основе процессов ассоциации-диссоциации составляющих его белков и их субъединиц. И, вероятно, перемещения "челнока" на электрофореграмме в канун нереста могут определяться его транспортной функцией. "Челнок" может поставлять клеткам энергетическое сырье в виде углеводов и липидов при активации обменных процессов в преднерестовый период, переносить целый ряд соединений, необходимых клеткам в процессе белкового синтеза, а также служить источником аминокислот наряду с альбуминами.

ЛИТЕРАТУРА

- Адамова Л.Г., Новиков Г.Г. Исследование белкового состава сыворотки крови растительноядных рыб // Научн. докл. высш. школы. Биол. науки. 1973. 5. 44-49.
- Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448с.
- Жукинский В.Н., Гош Р.И. Исследование жизнеспособности эмбрионов тарани и леща в зависимости от интенсивности энергообмена овулировавшей икры с целью разработки критериев оценки ее качества // Совр. вопросы экол. физиол. рыб. М.: Наука, 1979. 124-137.
- Ким Е.Д. Возрастная и ежегодная динамика содержания аминокислот в зрелых половых продуктах карпа // Разнокачественность раннего онтогенеза у рыб. Киев: Наукова Думка, 1974. 65-93.
- Кирсипуу А., Лаугасте К. О сезонных изменениях белкового обмена у леща // Совр. вопросы экол. физиол. рыб. М.: Наука, 1979. 174-179.

- Davis B.J. Disc-electrophoresis II Method and application to human serum proteins // Ann N.Y. Acad.Sci. 1964. 121. 404-427.
- Joshu P.C. Seasonal changes in the blood parameters of a hill - stream teleost, *Channa gachua* // Compar. Physiol. And Ecol. 1989. 14. 71-73.
- Kishida Mitsuyo, Specker Jennifer L. Vitellogenin in the surface mucus of tilapia *Oreochromis mossambicus* possibility for uptake by the free-swimming embryos // J Exp.Zool. 1994. 4. 259-268.
- Lowry O. H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J.Biol.Chem. 1951. 193. 265-275.
- Luskova V., Lusk S. Enzyme activities in the blood plasma of nase, *Chondrostoma nasus*, during spawning. // Folia zool. 1995. 44. 131-136.
- Kopperschlander G., Dicrel W., Bierwagen E., Hofman E. Molecular weights of bestium yongen durch polyacrylamid gel electrophorese unter verwendung eines linearen gel gradienten // FEBS Lett. 1969. 5. 221-227.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature (Gr Brit.). 1970. 4. 227. N 5259. 680-685.
- Mouche! N., Trichet V., Betz., Le Pennec J.-P., Wolff Jacques. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Gene. 1996. 174. 59-64.
- Mouridsen H.T., Wallevik K. Metabolic and gel-electrophoretic properties of albumin isolated from wound tissue // Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 1968. 22. 322-327.
- Ornstein L. Disc electrophoresis. I Background and theory // Ann. N. Y. Sci. 1964. 121. 321-349.
- Rønnestad I., Fyhn H., Gravningen K. The importance of free amino acids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*) // J. Exp. Biol. 1993. 176. 145-157.
- Silversand Shriester Hyllner Sven Johan, Haux Carl. Isolation, immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts // J Exp. Zool. 1993. 267. 587-597.
- Spector T. Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation // Anal.Biochem. 1978. 86. 142-146.
- Takemura Akihiro, Nunomura Wataru, Takano Kazunori, Hirai Hidematsu. Novel female protein with biological activities of C-reactive protein and lectin in a viviparous rockfish, *Sebastes taczanowskii* // J Exp. Zool. 1993. 266. 188-194.
- Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight-determination by DS-polyacrylamide gel electrophoreses // J.Biol.Chem. 1969. 244. 4406-4412.

БАЮНОВА Л.В., ПИСЕВИЧ С.Б., СЕМЕНКОВА Т.Б.

**СОДЕРЖАНИЕ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И НЕКОТОРЫХ
МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ
ОСЕТРА И БЕЛУГИ РАЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП ПОСЛЕ
ГОРМОНАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ**

Центральная лаборатория по воспроизводству рыбных запасов,
Санкт-Петербург

В настоящее время в связи с изменением экологической обстановки в Волго-Каспийском бассейне остается актуальной проблема оценки гормонального статуса мигрантов осетровых, заходящих в Волгу и используемых на рыбоводных заводах дельты. Значительную часть популяции осетра, заходящего в Волгу, составляют озимые мигранты. Возможность рыбоводного использования озимого осетра на Волге впервые была доказана И.А. Баранниковой (Баранникова и др., 1954) и затем подтверждена рядом исследователей (Казанский, 1979; Молодцов, 1983; Попова, 1983). В настоящее время на рыбоводных предприятиях наряду с производителями яровых осетра и белуги используются самки озимого осетра и белуги осеннего хода. Самок отлавливают осенью и в течение шести месяцев выдерживают в бассейнах с относительно невысокой проточностью; в результате происходит полное выключение этапа анадромной миграции задолго до нереста. В связи с этим возникает необходимость оценки физиологического статуса производителей после длительного резервирования в условиях рыбоводного завода.

Как известно, большую роль в адаптации к изменяющимся условиям внешней среды и в осуществлении стрессорных реакций играют кортикостероиды - гормоны интерреналовой железы (гомолога коры надпочечников млекопитающих). Согласно данным литературы, у осетровых основным кортикостероидом является кортизол (Idler, Truscott, 1980). Использование гистологического, флюорометрического, радиоиммунологического и иммуноферментного методов позволило выявить усиление синтетической и секреторной активности интерреналовой железы в морской период жизни у особей осетра по мере развития гонад, что, очевидно, связано с усилением метаболизма в период гаметогенеза и с подготовкой к анадромной миграции. В пери-

од анадромной миграции в реку происходит дальнейшее усиление активности интерренальной железы и повышение содержания кортизола в крови (Баранникова и др. 1978, 1990; Barannikova et al., 1997). Высокое содержание глюкокортикоидов в крови у рыб, в частности, у тихоокеанских лососей, осуществляющих анадромную миграцию на нерестилища, совпадает с относительной гипергликемией и откладыванием запасов гликогена в печени. Предполагается, что синергическое действие кортизола и инсулина позволяет регулировать глюконеогенез и обеспечивает эффективную утилизацию глюкозы в период анадромной миграции. При этом изменяется состав и количество сывороточных белков: усиливается активность протеолитических ферментов в мышцах, что на конечных этапах миграции обеспечивает процесс глюконеогенеза из аминокислот (Максимович, 1990). Показана функциональная изменчивость уровня протеинемии у производителей русского осетра в период нерестовой миграции, а также сезонные изменения уровня сывороточного белка (Лукьяненко и др., 1990).

Конечным звеном системы гормональных воздействий, связанных с осуществлением репродуктивной функции, являются половые стероиды. Активация функции стероидогенной ткани гонад выявлена у осетровых при осуществлении процесса вителлогенеза в морской период жизни. В связи с миграцией в реку и приближением периода размножения происходит усиление секреции основных половых стероидов (тестостерона, прогестерона, эстрадиола) в кровь (Баранникова и др., 1990). У мигрирующих рыб (лососи) отмечают увеличение уровня липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови; в них содержится до 60% эфиров холестерина (Бенсон и др., 1981). Роль холестерина, как предшественника в синтезе стероидов, чрезвычайно важна. Из исследованных половых стероидов наиболее изменчива концентрация тестостерона в крови. У самцов многих видов костистых рыб преобладающим андрогеном является 11-кетотестостерон. Роль андрогенов у самок чрезвычайно важна в период вителлогенеза. У самок русского осетра в вителлогенный период в сыворотке крови идентифицированы тестостерон и 11-кетотестостерон, причем содержание тестостерона было в 3 раза выше (Kime et al., 1996). У сибирского осетра описаны изменения концентрации тестостерона и 11-кетотестостерона при выращивании в условиях аквакультуры в течение года с пиком в сентябре и в конце репродуктивного цикла (Le Menu et al., 1997). У самок рыб большую роль в развитии и созревании половых клеток играют произ-

водные прогестерона, гидроксилированные в 17 и 20 положениях У русского осетра при инкубации ткани гонад с прегненолоном в инкубационной среде был выявлен 17-гидроксипрогестерон (Kime et al., 1996). В опытах на белом осетре показано, что овуляцию вызывают как прогестерон, так и его гидроксилированные производные (17- α -гидрокси-4-прегнен-3-он и 17- α -20- β -дигидрокси-4-прегнен-3-он) (Luttes, 1985). Наряду с инициацией овуляции показана роль прогестинов в осуществлении реакции спермации у самцов костистых рыб (Nagahama, 1987; Asahina et al., 1994). Высокое содержание прогестерона, выявленное у самцов осетра с использованием радиоиммунологического анализа, видимо, объясняется его участием в биосинтезе андрогенов (Баранникова и др., 1997; Kime et al., 1979).

При стимуляции созревания осетра и севрюги глицериновым гипофизарным препаратом происходило увеличение уровней прогестерона и тестостерона в сыворотке крови, а в период овуляции уровни половых стероидов несколько снижались (Баранникова и др., 1991).

В настоящей работе исследовано содержание кортизола, тестостерона, прогестерона, а также глюкозы, холестерина и белка у производителей русского осетра и белуги озимой и яровой форм после различных сроков резервирования в бассейнах. Предпринята попытка оценки гормонального статуса производителей осетра и белуги с различным качеством полученных половых клеток; проанализировано влияние дозы вводимого гипофизарного препарата на гормональные характеристики самок белуги.

Материалы и методы

Материал собран в период работы с производителями русского осетра и белуги на Александровском осетровом рыбноводном заводе (в дельте Волги) в апреле (белуга) и мае (осетр) 1996 - 97 гг. Пробы крови у рыб были взяты в момент получения половых продуктов после стимуляции созревания глицериновым гипофизарным препаратом (ГТП). Дозы препарата для осетров составили 100 лягушачьих единиц (Л. Е.) на самку и 65 Л. Е. на самца, что составляло, в среднем, 4 Л.Е./кг и 6 Л.Е./кг соответственно. Для белуг дозы были индивидуальными и составили для самок и самцов массой 50 кг – 4 Л.Е./кг. Для самок массой 150 кг доза ГТП составила 3,3 Л.Е./кг., массой 250 кг - 3 Л.Е. /кг. Качество полученных зрелых половых клеток оценивали у самок с помо-

шью определения доли нормально развивающихся зародышей на стадии малой желточной пробки (% НРЭ). Определение концентраций кортизола (К, нг/мл), тестостерона (Т, нг/мл), прогестерона (П, нг/мл) в сыворотке крови (СК) проводили с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) с использованием модифицированных коммерческих наборов (АлкорБио, Санкт-Петербург).

В ряде случаев (данные 1997 г.) в СК были определены концентрации холестерина (Х, ммоль/л), глюкозы (Г, ммоль/л) и общего белка (Б, г/л). Анализ был проведен с помощью модифицированных наборов фирмы Сопмау (Польша). Оптическую плотность образцов при анализе уровня гормонов и метаболитов крови измеряли на ридере E-LIZA MAT3000 (DRG, USA). Все полученные данные были обработаны статистически с применением критерия Стьюдента.

Авторы выражают глубокую благодарность А.А. Боеву и Н.С. Дубровской за участие в сборе материала.

Результаты

1. Содержание стероидов и метаболитов сыворотки крови у производителей русского осетра.

Самки озимого осетра, которых выдерживали в бассейнах завода в течение шести месяцев, после получения зрелых гамет имели значительно более низкий уровень К по сравнению с яровыми самками ($19,7 \pm 12,50$ и $52,7 \pm 7,39$ нг/мл соответственно, $p < 0,05$). По уровню Т эти рыбы не отличались ($43,8 \pm 14,20$ и $44,8 \pm 4,37$ нг/мл). При сравнении самцов, отловленных в конце апреля и выдержанных в прудах в течение месяца и в бассейнах в течение недели, была продемонстрирована тенденция к более низкому содержанию Т в СК у самцов после резервации в течение месяца ($70,4 \pm 10,29$ и $50,5 \pm 6,04$ нг/мл соответственно). Содержание К в СК было одинаковым в этих группах самцов ($48,2 \pm 3,48$ нг/мл и $41,8 \pm 16,12$ нг/мл соответственно) (рис. 1).

Самки и самцы русского осетра яровой формы после получения половых продуктов имели сходное содержание К в крови (в 1996 г. уровень К составил $52,7 \pm 7,39$ нг/мл у самок и $48,2 \pm 3,48$ нг/мл у самцов; в 1997 г. – $33,6 \pm 2,75$ и $26,6 \pm 2,42$ нг/мл соответственно). Уровень Т был достоверно выше у самцов по сравнению с самками (в 1996 г. концентрация Т была следующей: $70,4 \pm 10,29$ нг/мл у самцов и $44,8 \pm 4,37$

Стероиды (нг/мл)

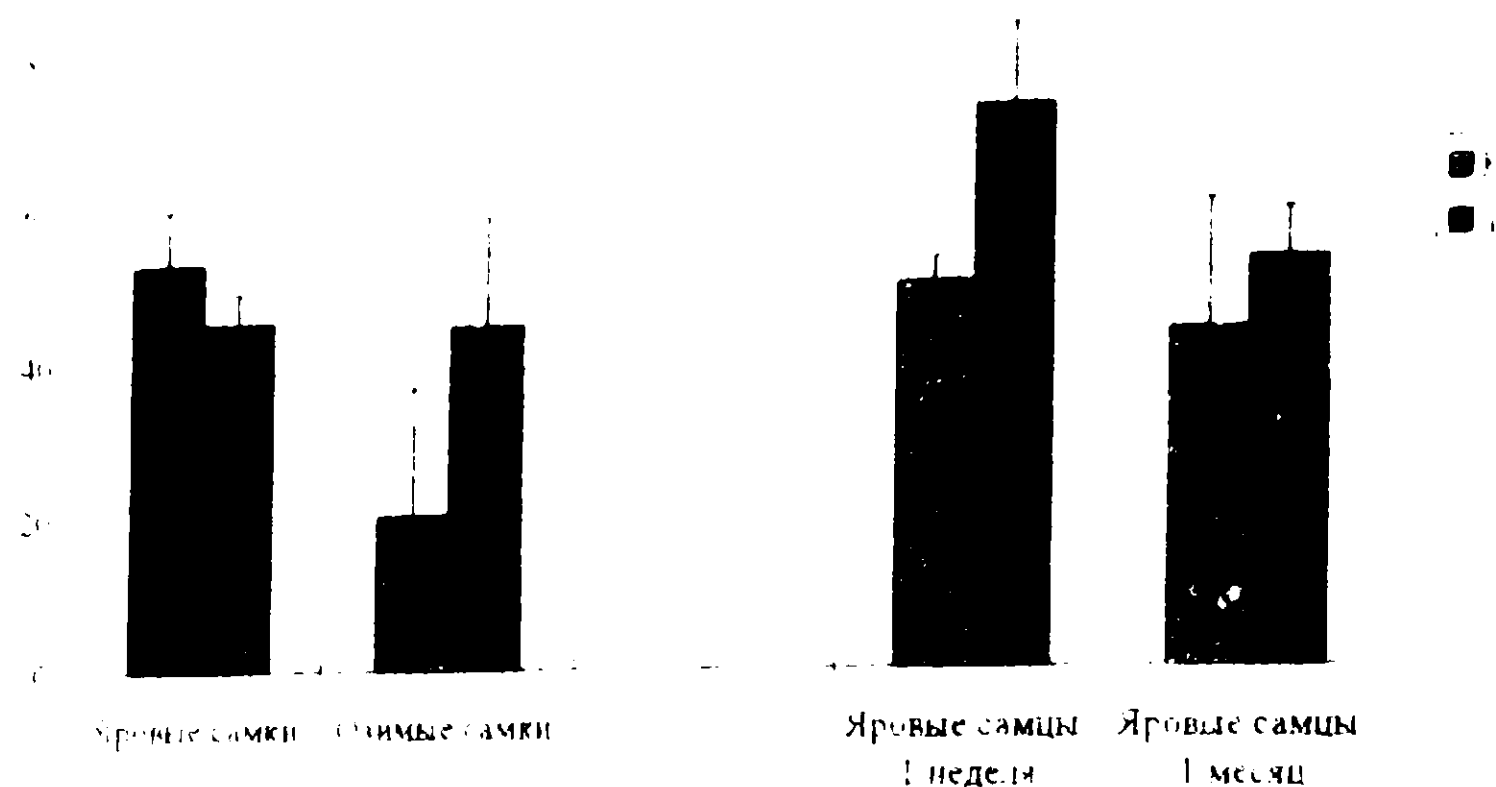


Рис. 1 Содержание стероидов в крови у производителей русского осетра в зависимости от сроков резервирования 1996 г. Достоверность отличий между зимними и яровыми самками * - $p < 0.05$

Стероиды (нг/мл)

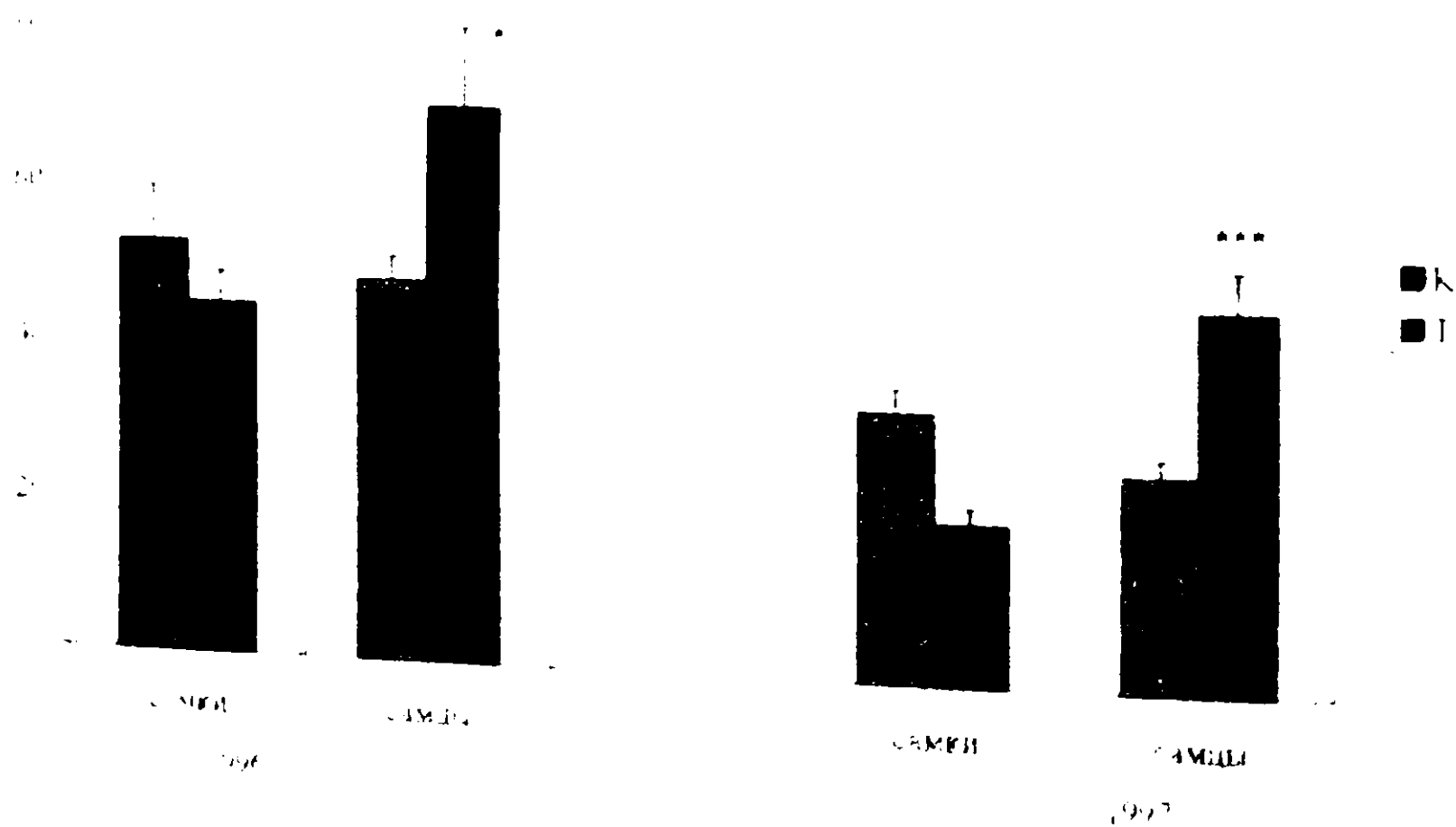


Рис. 2 Содержание стероидов в крови у производителей русского осетра яровой формы. Достоверность отличий между самками и самцами * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.001$

нг/мл у самок, $p < 0,05$; в 1997 г. - $20,1 \pm 2,18$ и $46,7 \pm 4,86$ нг/мл соответственно, $p < 0,001$) (рис. 2). Также было показано, что содержание Х, Г, Б достоверно выше у самцов по сравнению с самками (Х $1,9 \pm 0,16$ и $3,2 \pm 0,15$ ммоль/л, $p < 0,001$; Г. $1,7 \pm 0,12$ и $3,4 \pm 0,15$ ммоль/л, $p < 0,001$; Б $12,5 \pm 1,09$ и $22,4 \pm 1,41$ г/л, $p < 0,001$). Таким образом, по этим параметрам прослеживаются половые отличия, причем по уровню Т различия для двух лет сходны.

По содержанию К и Т у самок осетра с разным качеством половых продуктов существенных различий получено не было. У самцов с плохим и хорошим качеством спермы отмечен более высокий уровень К у рыб, не давших спермы или продуцировавших сперму низкого качества ($52,1 \pm 8,66$ и $25,2 \pm 2,44$ нг/мл соответственно, $p < 0,01$).

II. Содержание стероидов и метаболитов сыворотки крови у производителей белуги

В ходе длительного резервирования белуги происходит снижение содержания К в СК у озимых самок, которые выдерживались в бассейнах завода в течение шести месяцев. В 1996 году у озимых самок белуги содержание К составило $34,6 \pm 12,3$ нг/мл, у яровых самок - $61,1 \pm 15,8$ нг/мл. В 1997 г. данные по К сходны с данными 1996 г.: $34,4 \pm 3,92$ нг/мл, $65,6 \pm 7,09$ нг/мл соответственно (рис. 3). При более подробном рассмотрении сроков резервации самок белуги, а именно 1 сутки, 5-7 суток, 14 суток для яровых и шесть месяцев для озимых можно видеть, что наиболее высокий уровень К наблюдается у яровых самок, от которых были получены зрелые половые клетки без предварительной резервации. При этом наиболее высок и коэффициент вариации ($C_v = 89\%$). При выдерживании в бассейнах уже в течение нескольких дней средний уровень К понижается. По мере выдерживания самок уменьшается C_v по этому показателю (рис. 4). Уровень Т в 1997 г. был достоверно выше у яровых самок по сравнению с озимыми ($21,2 \pm 1,78$ нг/мл у яровых самок и $12,5 \pm 1,85$ нг/мл у озимых, $p < 0,05$) (рис. 3). Сходная тенденция была отмечена и в 1996 г. (у яровых самок содержание Т - $10,3 \pm 2,65$ нг/мл; у озимых самок - $7,0 \pm 2,49$ нг/мл). В 1996 г. содержание П у озимых и яровых самок составляло $0,53 \pm 0,178$ и $0,69 \pm 0,179$ нг/мл, в 1997 г. - $0,71 \pm 0,205$ нг/мл и $1,26 \pm 0,35$ нг/мл соответственно.

Стероиды (нг/мл)

100

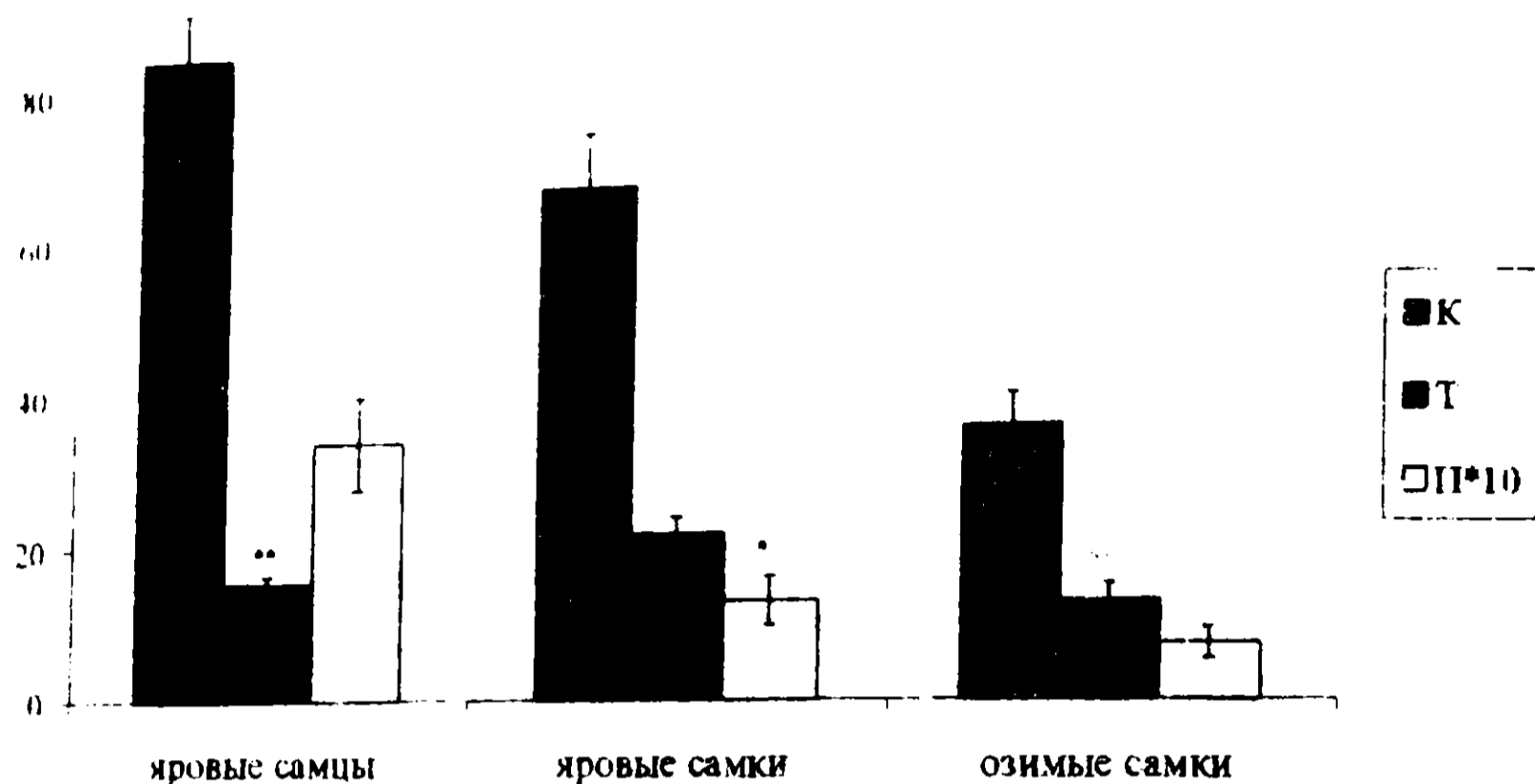


Рис. 3 Содержание стероидов в крови у производителей белуги в 1997 г. Достоверность отличий между самками и самцами: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; между озимыми и яровыми самками: ^ - $p < 0,01$; ^^^ - $p < 0,001$.

Стероиды (нг/мл)

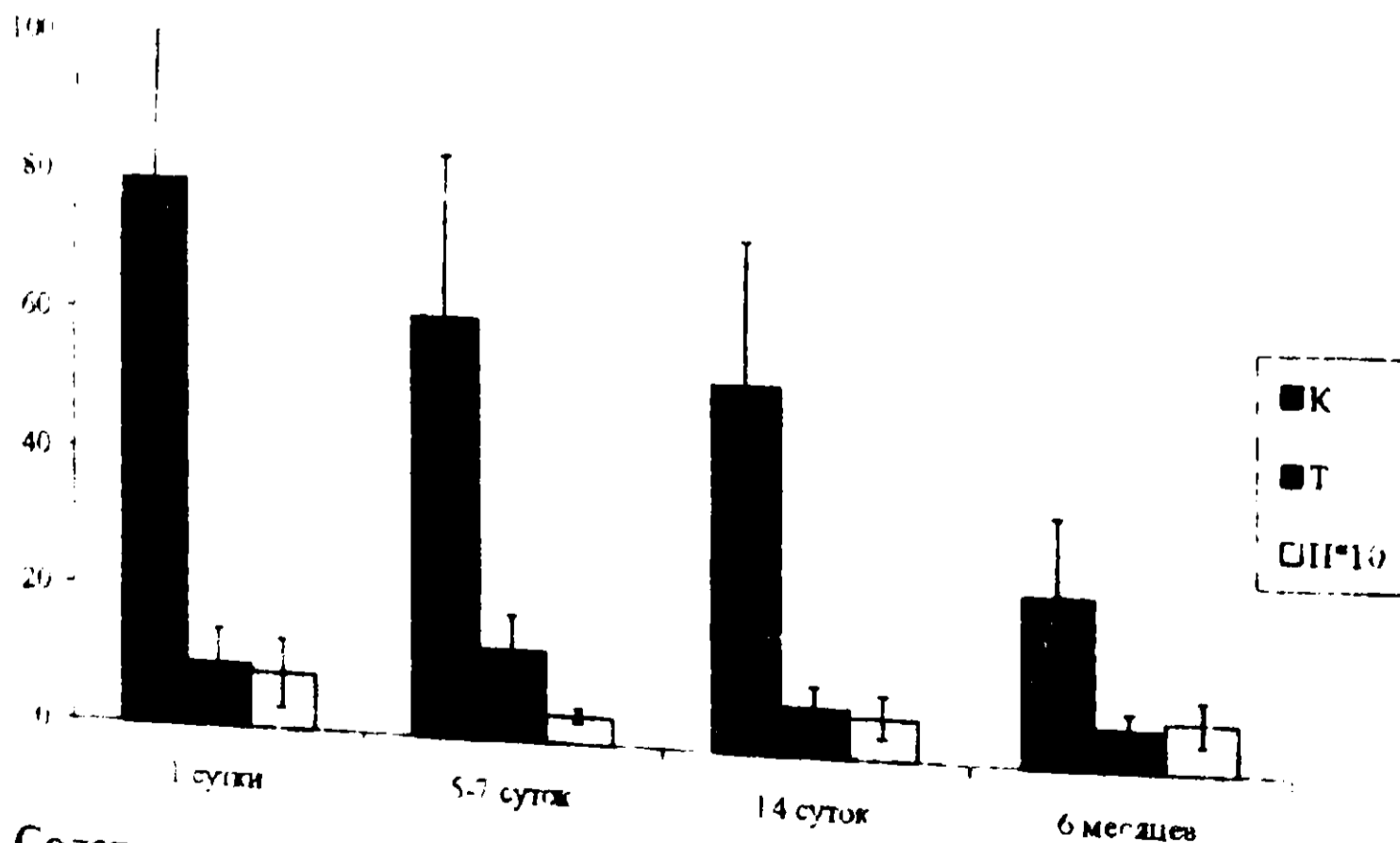


Рис. 4 Содержание стероидов у самок белуги в зависимости от сроков резервирования 1996 г.

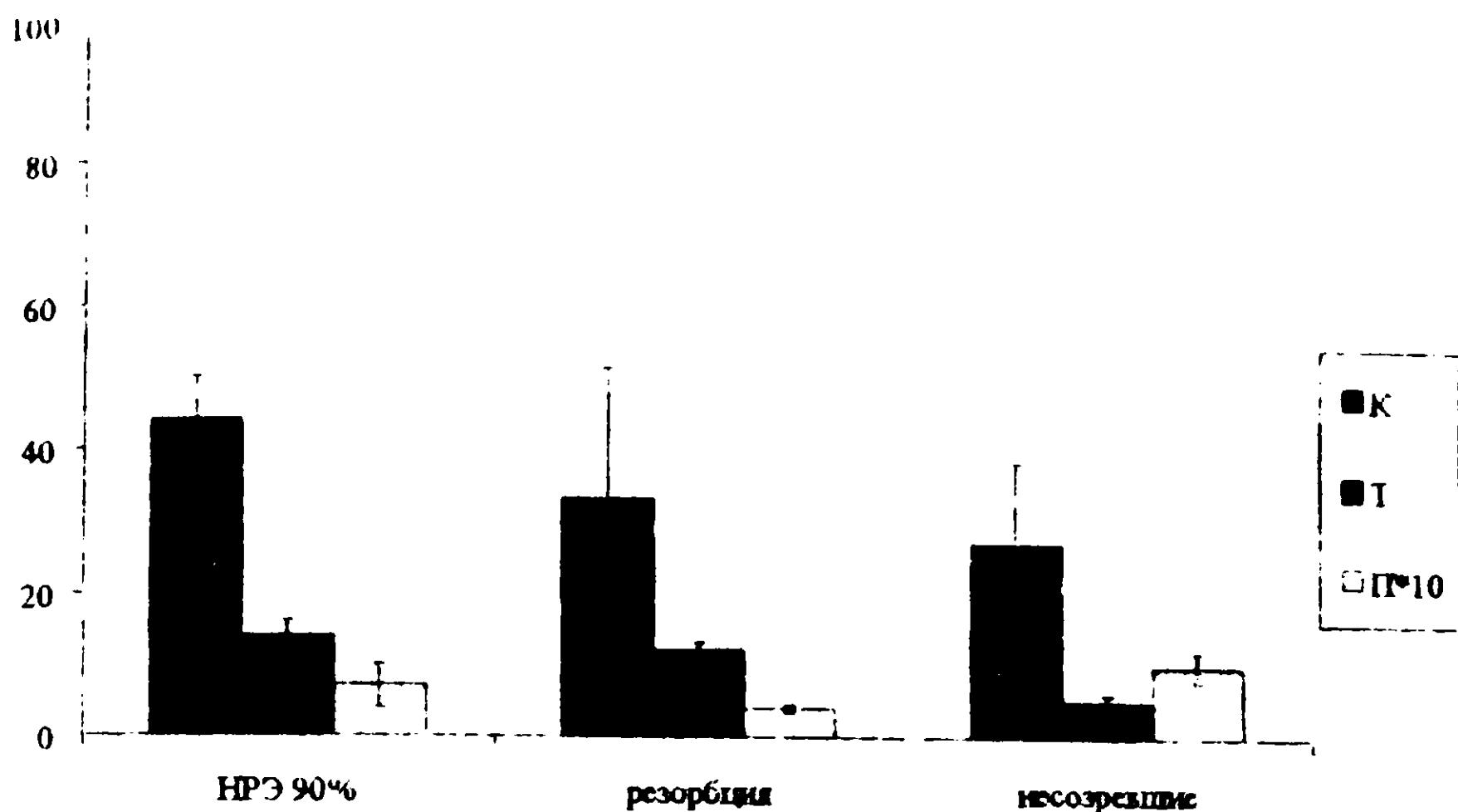


Рис. 5. Содержание стероидов в крови у озимых самок белуги в зависимости от % HPЭ в 1997 г. Достоверность отличий между созревшими и несозревшими самками: ^^ - $p < 0,01$.

В ходе выдерживания происходит снижение содержания общего белка в сыворотке, что характерно для непитающихся рыб. Пониженный уровень холестерина, предпественника стероидов, у яровых рыб свидетельствует, по-видимому, о более высоком уровне синтеза-стероидных гормонов, в данном случае кортизола и тестостерона, а, возможно, и прогестерона, так как отмечена тенденция к снижению его концентрации у озимых особей.

В течение двух рыбоводных сезонов прослеживается четко выраженная тенденция к более высокому содержанию К у яровых самцов по сравнению с самками, однако эти различия недостоверны. В 1996 году у яровых самок белуги содержание К составило $61,1 \pm 15,8$ нг/мл, у яровых самцов – $72,4 \pm 22,9$ нг/мл; в 1997 г. – $65,6 \pm 7,09$ и $83,9 \pm 6,24$ нг/мл соответственно (рис. 3). Содержание Т более высокое у самок по сравнению с самцами. В 1996 г. содержание Т у яровых самок составило $10,3 \pm 2,65$ нг/мл, у яровых самцов – $6,1 \pm 1,94$ нг/мл; в 1997 г. – у самок – $21,2 \pm 1,78$ нг/мл, у самцов – $15,3 \pm 1,44$ нг/мл, $p < 0,01$. Содержание П у яровых самцов по сравнению с яровыми самками было выше по данным двух лет. В 1996 г. содержание П у самцов соответствовало

ммоль/л 1/л

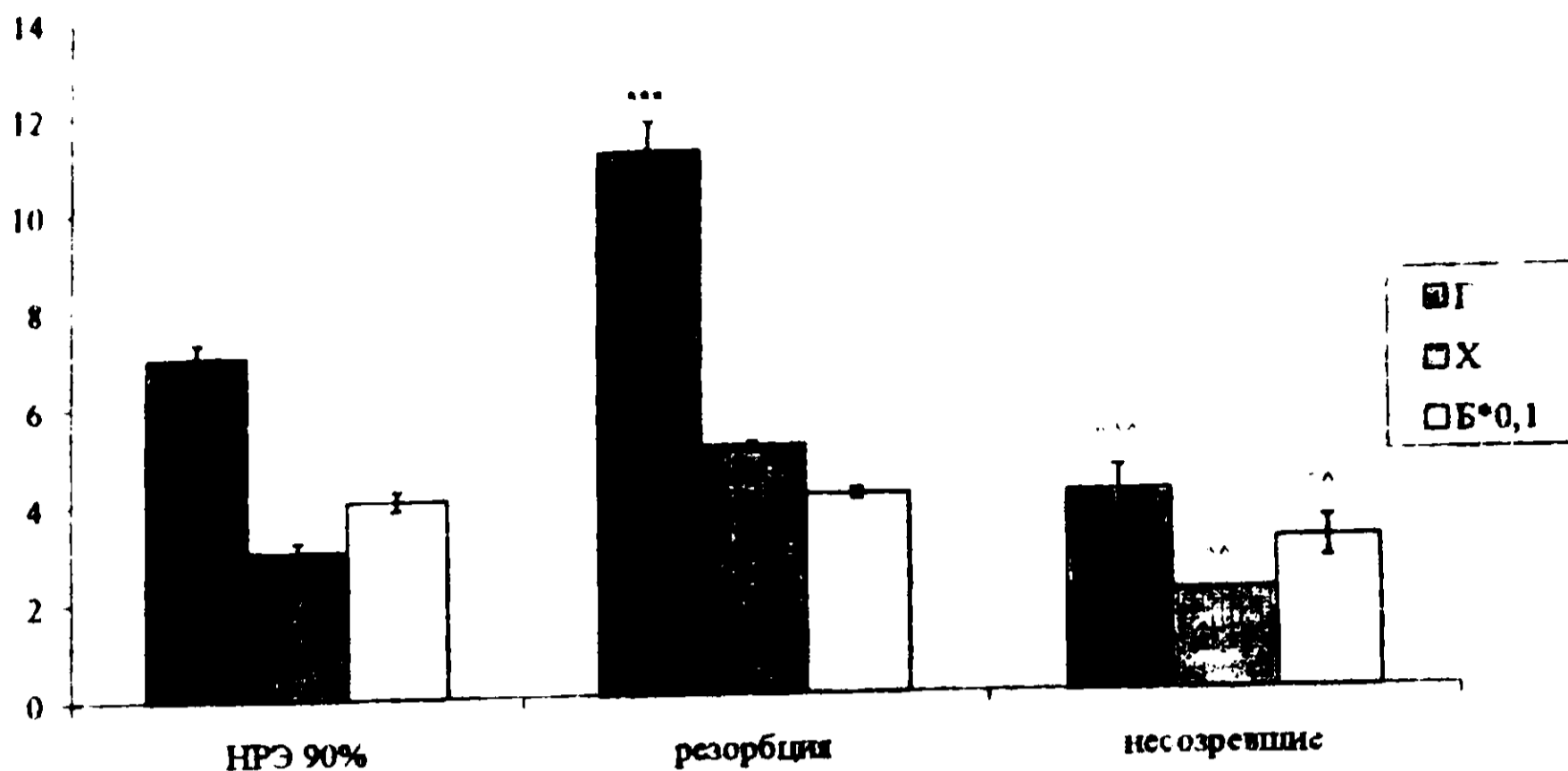


Рис. 6. Содержание глюкозы, холестерина (ммоль/л) и общего белка (г/л) в сыворотке крови у озимых самок белуги в зависимости от % НРЭ. 1997 г. Достоверность отличий между созревшими и незревшими самками: ^^ - $p < 0,01$; ^^^ - $p < 0,001$.

$4,83 \pm 1,53$ нг/мл, у самок – $0,69 \pm 0,18$ нг/мл, $p < 0,05$. В 1997 г. – $3,33 \pm 0,61$ нг/мл и $1,26 \pm 0,35$ нг/мл соответственно, $p < 0,05$. У самок и самцов яровой группы также отмечены различия в содержании холестерина и глюкозы: эти показатели ниже у самцов (Х: $2,7 \pm 0,13$ ммоль/л у самок, $2,3 \pm 0,13$ ммоль/л у самцов, $p < 0,05$; Г: $7,4 \pm 0,70$ ммоль/л у самок, $5,8 \pm 0,32$ ммоль/л у самцов, $p < 0,05$).

У самок белуги было проанализировано содержание К, Т, П, Х, Г, Б в СК в зависимости от массы и дозы ГГП на единицу массы. При сопоставлении дозы (Л.Е./кг) и уровня гормонов в сыворотке крови достоверные различия выявлены для тестостерона: с увеличением дозы его концентрация в сыворотке снижается. При средней дозе 2,7 Л.Е./кг содержание тестостерона составляет 23,6 нг/мл, при дозе 7,5 Л.Е./кг – 9,9 нг/мл, $P < 0,05$. Уровень К в сыворотке демонстрирует четкую тенденцию к снижению у незревших рыб и рыб с резорбцией икры (рис. 5) Интересно отметить, что незревшие самки достоверно отличаются от рыб, давших нормальную икру по нескольким параметрам: у них ниже концентрации Т, Х, Г и Б в сыворотке крови. У самок

с резорбцией икры в СК наблюдался высокий уровень глюкозы, по-видимому, вследствие усиления процессов глюконеогенеза у этих рыб (рис. 6).

Обсуждение

В ходе длительного резервирования производителей осетровых происходит снижение концентрации К, Т и Б в СК, что свидетельствует об изменении характера стероидогенеза и снижении уровня белкового метаболизма, и обусловлено, по-видимому, прерыванием анадромной миграции. Ранее было показано, что у озимых и яровых мигрантов русского осетра в дельте Волги в мае содержание Т в СК не различается (Баранникова и др., 1997). При задержке в районе Волжской ГЭС у русского осетра озимой формы происходит уменьшение уровней К и Т в СК (Баранникова и др., 1990) и сывороточного белка (Лукьяненко и др., 1990).

По-видимому, стероиды, в особенности Т и К, выполняют функцию регуляции полового поведения наряду с участием в системе обратных связей с гормонами гипоталамо-гипофизарной системы. Эти предположения подтверждены данными радиорецепторного анализа для озимого осетра: обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между концентрацией Т в крови и содержанием рецепторов к нему в цитозолях переднего мозга и гипоталамуса (Barannikova, Feldscoen, 1995).

Интенсивность и направление стероидогенеза отличаются у самцов и самок (Scott, Baynes, 1982), что проявляется в различии уровней половых стероидов на разных этапах репродуктивного цикла. В момент получения зрелых половых клеток после стимуляции созревания ГГП у самцов осетра уровень Т был выше по сравнению с самками, а у самцов белуги было повышено содержание П, уровень Т был ниже (по сравнению с самками). Половые различия в содержании стероидов были отмечены у русского осетра, выловленного в местах нагула в Среднем Каспии и в начале анадромной миграции в Волгу (Баранникова и др., 1990; Буковская, Баюнова, 1989). В приплотивной зоне у русского осетра содержание К было выше в СК у самцов (Баюнова, 1997). У особей вслоноса после отлова из реки отмечали более высокое содержание К, Х в СК самцов по сравнению с самками (Grant et al., 1970).

- Brooks S., Pottinger T.G., Tyler C.R., Sumpter J.P.* Does cortisol influence egg quality in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* // Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Austin. Texas. 1995. 180.
- Campbell P., Pottinger T., Sumpter J.* Preliminary evidence that chronic confinement stress reduce the quantity of gametes produced by brown and rainbow trout // *Aquaculture*. 1994. 120. 151-169.
- Grant B.F., Mehrle P.M., Pussel T.S.* Serum characteristics of spawning paddlefish (*Polyodon spathula*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. 37. 321-330.
- Idler D. R., Truscott B.* Phylogeny of vertebrate adrenal corticosteroids // In: *Evolution of Vertebrate Endocrine Systems*. P.K.T. Pang and A. Eppler, eds. Texas Tech University. 1980.
- Kime D. E.* Androgen biosynthesis in teleost and elasmobranch fishes // *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 1979. Part B. 429-435.
- Kime D.E., Lambert J.G.W.E., Bukovskaya O.* Steroid synthesis by gonads of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti* // *Ann. D'Endocrinol.* 1996. 57, P.22.
- Le Menn F., Pelissero-Benettou C., Williot P., Cuisset-Davail B.* Female siberian sturgeon, *Acipenser baeri*: an interesting model for reproduction physiology studies in fish // In: *Abstr. Pap. 3 International Symposium on Sturgeon*. Piacenza. Italy. 1997. A1-O.
- Lutes P.B.* Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: some mechanisms and applications // *Environ. Biol. Fish.* 1985. 14. 87-92.
- Nagahama Y.* Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads // *Zool.Sci.* 1987. 4. 209-222.
- Semenkova T.B., Bayunova L.V., Boev A.A., Dyubin V.P.* Stress influence on serum cortisol levels in sturgeon aquaculture // In: *Abstr. Pap. 3 International Symposium on Sturgeon*. Piacenza. Italy. 1997. A-1.
- Scott A.P., Baynes S.M.* Plasma levels of sex steroids in relation to ovulation and spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Proceedings of the International Symp. Reprod. Physiol. of Fish*. Wageningen. 1982. 103-106.

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ
СТЕРОИДСЕКРЕТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ГОНАД ОСЕТРОВЫХ И
ЛОСОСЕВЫХ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

БиНИИ СПбГУ, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

В литературе широко освещается важная роль системы гипоталамус-гипофиз-гонады в регуляции репродуктивной функции (Hoar, Randall, 1969; Idler, 1969; Dodd, 1972; Баранникова, 1975; Поленов, 1975; Гарлов, Поленов, 1996; Бурлаков, 1997). В настоящее время в этой системе наиболее изучены нейросекреторное и гонадотропное звенья. Многие аспекты структурной организации и функции низшего звена этой иерархической системы - стероидсекретирующей ткани гонад - до сих пор остаются слабо изученными (Поленов, Гарлов, 1989; Гарлов, Поленов, 1996). Сведения о происхождении, локализации, дифференцировке и функциональной морфологии стероидогенных клеток (СК), особенно в раннем онтогенезе рыб (на ключевых этапах формирования половых желез: закладке, анатомической и цитологической сексуализации гонад) и, даже в период размножения, носят отрывочный и случайный характер.

Основной целью начатых нами работ является изучение функциональной морфологии СК гонад на разных этапах онтогенеза двух далеких в систематическом отношении, но экологически сходных (проходных) групп рыб (горбуша и осетр) и генетически близких, но различных по экологии видов - моноциклической горбуши и полициклической форели. Задачей настоящего исследования являлось: 1) определение сроков появления СК в гонадах молоди, 2) выявление их возможных полоспецифических различий и путей дифференцировки и 3) изучение морфофункциональных особенностей СК в гонадах половозрелых рыб в период нереста

Материалы и методы

Работа проводилась на молоди радужной форели и горбуши, выращенной в лаборатории ихтиологии Биологического института

СПбГУ. Сроки фиксации для форели были выбраны в соответствии с имеющимися данными о темпе гонадо- и гаметогенеза в данных условиях (Захарова, 1989, Зсленников, 1996). Светооптически и электронно-микроскопически исследованы гонады 11 особей форели (самцов и самок) до, в период и после дифференцировки пола (в возрасте 30, 45 и 75 сут после вылупления) и двух самок горбуши в период ската. Светооптически, электронно-микроскопически и цитохимически была изучена также структура и ультраструктура клеток теки и гранулезы фолликулов развивающихся, зрелых ооцитов и постовуляторных фолликулов в яичнике осетра и севрюги. Для световой микроскопии ткани яичника 5 самок осетра фиксировали в жидкости Буэна и после обезвоживания заключали в парафин-воск. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали азаном по Гейденгайну.

Для комплексного светооптического и электронно-микроскопического анализа использованы ткани яичника четырех самок осетра, при этом яичники двух из них находились в IV стадии зрелости гонад (СЗГ), а двух других - в VI СЗГ, (т.е. до и после овуляции). Ткань яичников осетра, также как и гонады молоди радужной форели и горбуши фиксировали в 6%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, постфиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 на фосфатном буфере и заключали в Эпон-812. Поиск участков теки и гранулезы фолликулов яичника осетра, как и предварительное определение пола у молоди форели осуществляли на неокрашенных срезах (5-9 мкм), полученных с помощью обычного микротом, под фазовым контрастом, а также на полутонких срезах, окрашенных толуидиновым, либо метиленовым синим. Ультратонкие срезы, приготовленные с помощью ультратома LKB-3, контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM-7 и Tesla-500.

Для подтверждения предположения о том, что клетки теки фолликулов яичника осетровых при морфологически ярко выраженных структурах, характерных для гладкомышечных элементов, являются также и стероидсекретирующими (Поленов, Гарлов, 1989), была проведена ультрацитохимическая реакция по выявлению ключевого фермента стероидного синтеза - 3β -гидроксистероиддегидрогеназы - 3β -ГСДГ (Berchtold, 1977). Изучены яичники четырех самок осетра (III-IV СЗГ) и одной - севрюги (IV СЗГ), ультратонкие срезы которых контрастировали только цитратом свинца по Рейнольдсу.

Результаты

1. Радужная форель

В строме гонад у рыб в возрасте 30 суток СК с характерными ультраструктурными признаками стероидного синтеза обнаружены поодиночке или небольшими группами (по 2-4) в эпителии гонады, субэпителиально, а также в основании мезорхия. Эти клетки размером от 3 до 12 мкм имеют вытянутую или округлую форму (рис. 1а). Светлое округлое или овальное ядро занимает не менее половины объема клетки, хроматин концентрируется по периферии, перинуклеарное пространство узкое. Цитоплазма СК светлая, содержит умеренное количество округлых или вытянутых митохондрий с трубчато-везикулярными кристами и светлым матриксом, размерами от 0,3 до 0,8 мкм. Канальцы хорошо развитого гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР) нередко набухшие. Обнаружены также лизосомы и единичные липидные включения (0,3-0,7 мкм).

В семенниках СК обнаружены в возрасте 45 суток (рис. 1б). Также как и вышеописанные СК, они выделяются среди окружающих клеток светлой цитоплазмой, большим количеством овальных или удлиненных митохондрий с трубчато-везикулярными кристами и светлым матриксом (0,3-0,8 мкм). Однако СК семенников отличаются округлой формой (8-10 мкм) и лопастным ядром (рис. 1б). Хроматин локализуется также по периферии ядра, перинуклеарное пространство узкое на всем протяжении. Еще одной отличительной особенностью СК в семенниках форели в этот период является уже хорошо развитый агранулярный эндоплазматический ретикулум (АЭР) и комплекс Гольджи (КГ). Характерно для этих клеток также наличие в цитоплазме лизосом, мультиламеллярных телец (МЛТ) (0,2-0,8 мкм) и одной-двух крупных вакуолей (1,5-2 мкм). Единичные липидные включения, обнаруживаемые в этих СК, по размерам (1,5-2 мкм) гораздо крупнее, чем в описанных выше СК на индифферентном этапе развития гонад.

В яичниках форели СК с четко выраженными ультраструктурными признаками стероидного синтеза впервые выявлены уже после дифференцировки пола (в возрасте 75 сут) (рис. 1в). Обнаруженные нами СК располагаются группами (по 2-3 клетки) рядом с оогониями или поодиночке в фолликулах превителлогенных ооцитов вблизи кровеносных сосудов. Это округлые светлые клетки, уже более крупные

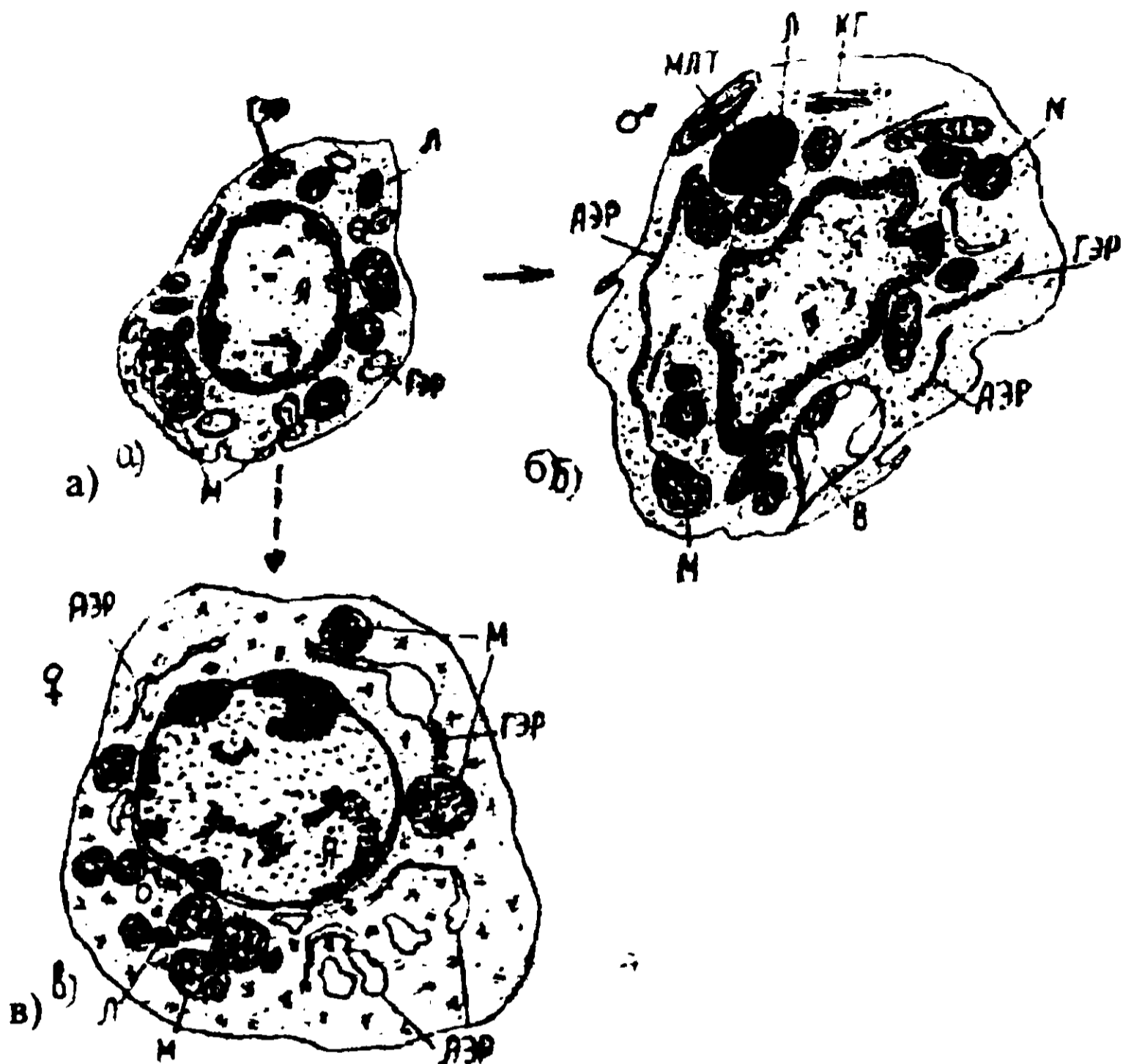


Рис. 1. Схема ультраструктурной организации стероидсекретирующих клеток в гонадах радужной форели разной степени дифференцировки в возрасте 30(а), 45(б) и 75(в) сут. (Мосягина, 1998). АЭР - агранулярный эндоплазматический ретикулум, В - вакуоль, ГЭР - гранулярный эндоплазматический ретикулум, КТ - комплекс Гольджи, Л - липиды, М - митохондрии, МЛТ - мультислойное тельце.

(15-17 мкм). Они имеют светлые ядра с пристеночно расположенным хроматином и, в основном, узким перинуклеарным пространством. Размеры ядра, как правило, не превышают половины объема клетки. Цитоплазма содержит митохондрии с трубчато-везикулярными кристами, АЭР, большое количество свободных рибосом и МЛТ. В отличие от описанных выше СК в семенниках, в СК яичников радужной форели обнаружены только мелкие липидные включения (0,2-0,3 мкм), расположенные в непосредственной близости от митохондрий.

2. Горбуша.

Изучение фолликулярных оболочек ооцитов протоплазматического роста в яичниках молоди горбуши в период ската показало, что клетки теки имеют удлинненную форму и такое же вытянутое, неправильной формы ядро (длиной 6-11 мкм), богатое хроматином (рис. 2а).



Рис. 2. Ультраструктура стероидсекретирующих клеток теки фолликула преовуляторного ооцита в яичнике горбуши в период ската. а – участок цитоплазмы ооцита с клетками фолликулярного эпителия (увел. 10500х), б – клетка теки (увел. 21000х); АЭР – агранулярный эндоплазматический ретикулум, ГГ – зернистые включения, сходные с гранулами гликогена, ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум, МВ – макропокринный вырост клетки, МХ – митохондрия с трубчатovesикулярными кристами. О – ооцит, ЯКТ – ядро клетки гранулезы, ЯКТ – ядро клетки теки

В цитоплазме содержится 1-6 крупных округлых митохондрий с четко выраженными трубчато-везикулярными кристами и светлым матриксом. АЭР хорошо развит. Просвет канальцев ГЭР местами заполнен электронноплотным содержимым. Миофибрилл в описываемых клетках не обнаружено. Цитоплазма таких клеток иногда может образовывать своеобразные макроапокриновые выросты (1,5-2 мкм), в которых помимо полисом и митохондрий, содержится множество разного размера вакуолей (рис. 2,б). Клетки гранулезы также вытянуты и уплощены, имеют веретеновидные ядра, богатые хроматином (длиной 8-11 мкм) (рис. 2а). Их плазмалемма непосредственно контактирует с плазмалеммой ооцита, образуя микроворсинки. На стороне, обращенной к клеткам теки, отмечаются картины эндоцитоза. Цитоплазма этих клеток темнее, чем у клеток теки и содержит большое количество рибосом. Органоиды концентрируются у полюсов ядра. Крупные митохондрии округлой, чаще вытянутой неправильной формы, с пластинчатыми или переходного к трубчато-везикулярному типу кристами нередко содержат мелкие электронноплотные включения, напоминающие зерна гликогена (рис. 2б). ГЭР хорошо развит. В периферической зоне цитоплазмы часто встречаются крупные вакуоли. Липидных включений в этот период как в клетках оболочек фолликулов, так и в стромальных клетках яичника не обнаружено.

3. Осетровые.

При комплексном светооптическом и электронно-микроскопическом изучении клеток теки фолликулов в яичниках половозрелых особей осетра и севрюги показано, что эти клетки обнаруживают типичные черты гладкомышечных элементов - мощное развитие в цитоплазме трех типов миофиламентов, образующих в целом непрерывную систему, наличие саркоплазматической сети, многочисленных кавеол и плотных телец, концентрация органоидов у полюсов клетки (рис. 3). Структуры, характерные для стероидогенных элементов выражены более слабо, они представлены небольшим количеством митохондрий с трубчато-везикулярными кристами, единичными липидными включениями и слабо развитым АЭР.

Перед нерестом эти СК немногочисленны, сильно уплощены, их веретеновидные ядра (длиной 9-10 и шириной 1-1,5 мкм), содержат 1-2 ядрышка и богаты хроматином (рис. 3а). Признаки миоидной и стероидогенной функций выражены относительно слабо. В цитоплазме



Рис. 3. Схема ультраструктурной организации миоидно-секреторных клеток (МСК) теки фолликулов яичника осетровых рыб (Гарлов, Мосягина, 1998). а - ма-лодифференцированная МСК теки фолликулов с превителлогенными роцитами; б - МСК те-ки зрелых фолликулов перед овуляцией, в, г - МСК теки постовуляторных фолликулов, находящихся в состоянии умеренного сокращения; д- МСК теки постовуляторных фолликулов в состоянии сокра-щения. К - кавеолы, Л - липидные капли, МВ - макроапокриновый вырост клетки, МФ - миофиламенты, МХ - митохондрии, ПТ - плотные тельца, С - саркоплазматическая сеть.

некоторых клеток выявляются продольно ориентированные редкие пучки филаментов всех типов. Митохондрий в описываемых клетках мало, они крупные (до 1,2 мкм), с плотным матриксом и четко выра-женными в основном пластинчатыми кристами. Кавеол и элементов саркоплазматической сети также очень мало. Иногда в этих клетках обнаруживаются липидные капли небольшого размера (0,5-1,5 мкм) и различной электронной плотности. Они располагаются у полюсов клетки, среди расширенных канальцев ГЭР и АЭР. Рядом обнаружи-ваются единичные мелкие лизосомы, чаще всего в виде мультиламме-ярных телец размером 0,5-0,9 мкм. Выросты на поверхности этих

При цитохимическом выявлении β -ГСДГ именно в клетках теки фолликулов перед нерестом на ультраструктурном уровне было обнаружено, что продукт реакции выявляется в цитоплазме в виде небольших скоплений мелких электронноплотных гранул (5-15 нм) преимущественно вдоль плазмалеммы (рис. 4). В цитоплазме глубже расположенных клеток фолликулярного эпителия, в частности в клетках гранулезы, особенно богатых крупными митохондриями с трубчато-везикулярными кристами и липидными включениями, продукта реакции не обнаружено. Клетки гранулезы богаче цитоплазмой и имеют относительно более округлые ядра (длиной 7-10 мкм и шириной 2-3 мкм), богатые хроматином (рис. 5). В их цитоплазме помимо митохондрий и липидных включений, постоянно выявляется большое количество вакуолей различного размера (до 1,5 мкм), многие из которых происходят от сильно набухших канальцев ГЭР и АЭР. Лишь единичные из них содержат зернистое аморфное вещество. Яркие морфофункциональные изменения в период нереста обнаружены нами в теке фолликулов яичника осетра.

После нереста, в постовуляторных фолликулах яичника, эти СК теки, вытянутой, но уже полигональной формы, образуют плотный многорядный слой. На их поверхности обнаруживаются широкие короткие выросты (рис. 3в, г, д), которые могут анастомозировать между собой. На плазмалемме часто выявляются осмиофильные зоны, которые соответствуют плотным тельцам плазмалемм гладкомышечных клеток, местам прикрепления миофиламентов. Ядра овальной, неправильной формы, иногда лопастные, с хорошо выраженными складками на поверхности, имеют 1-2 ядрышка. В цитоплазме СК хорошо видны мощные пучки, либо плотные сплетения миофиламентов, большинство из которых ориентировано вдоль длинной оси клетки. В периферической зоне цитоплазмы встречаются местами расширенные канальцы саркоплазматической сети и многочисленные кавеолы. ГЭР развит умеренно и располагается у полюсов ядра, где канальцы ГЭР переходят в АЭР. КГ развит слабо. Здесь же различимы единичные микро-трубочки и сконцентрировано основное количество полисом. Среди канальцев ГЭР и АЭР находятся скопления митохондрий преимущественно округлой, реже удлинённой формы со светлым матриксом и либо пластинчатыми, либо трубчато-везикулярными кристами. В некото-



Рис. 4. Выявление β -ГСД в миоидно-секреторной клетке (МСК) теки фолликула превителлогенного ооцита в яичнике осетра. Продукты реакции выявляются в виде небольших скоплений гранул вдоль плазматеммы (стрелки). Вне МСК теки продукты реакции отсутствуют. Увел. 15000х.

рых митохондриях выявляются единичные образования умеренной электронной плотности, напоминающие липидные капли.

Часть клеток теки в постовуляторных фолликулах находится в состоянии сокращения (рис. 3д). Их поверхность, также как и оболочки ядра, имеет хорошо выраженные складки. В цитоплазме, особенно в перинуклеарной зоне, выявляется высокая концентрация рибосом. Органеллы концентрируются строго у полюсов ядра, причем канальцы ГЭР и митохондрии нередко оказываются набухшими. Пучки миофиламентов располагаются более рыхло и хаотично, чем в несокращенных клетках, а на складках поверхности клетки четче выявляются многочисленные укороченные и утолщенные плотные тельца.

В цитоплазме большинства клеток наблюдаются характерные картины секреции: формирование и экзоцитоз многочисленных секреторных пузырьков, реже - образование макроапокриновых выростов на

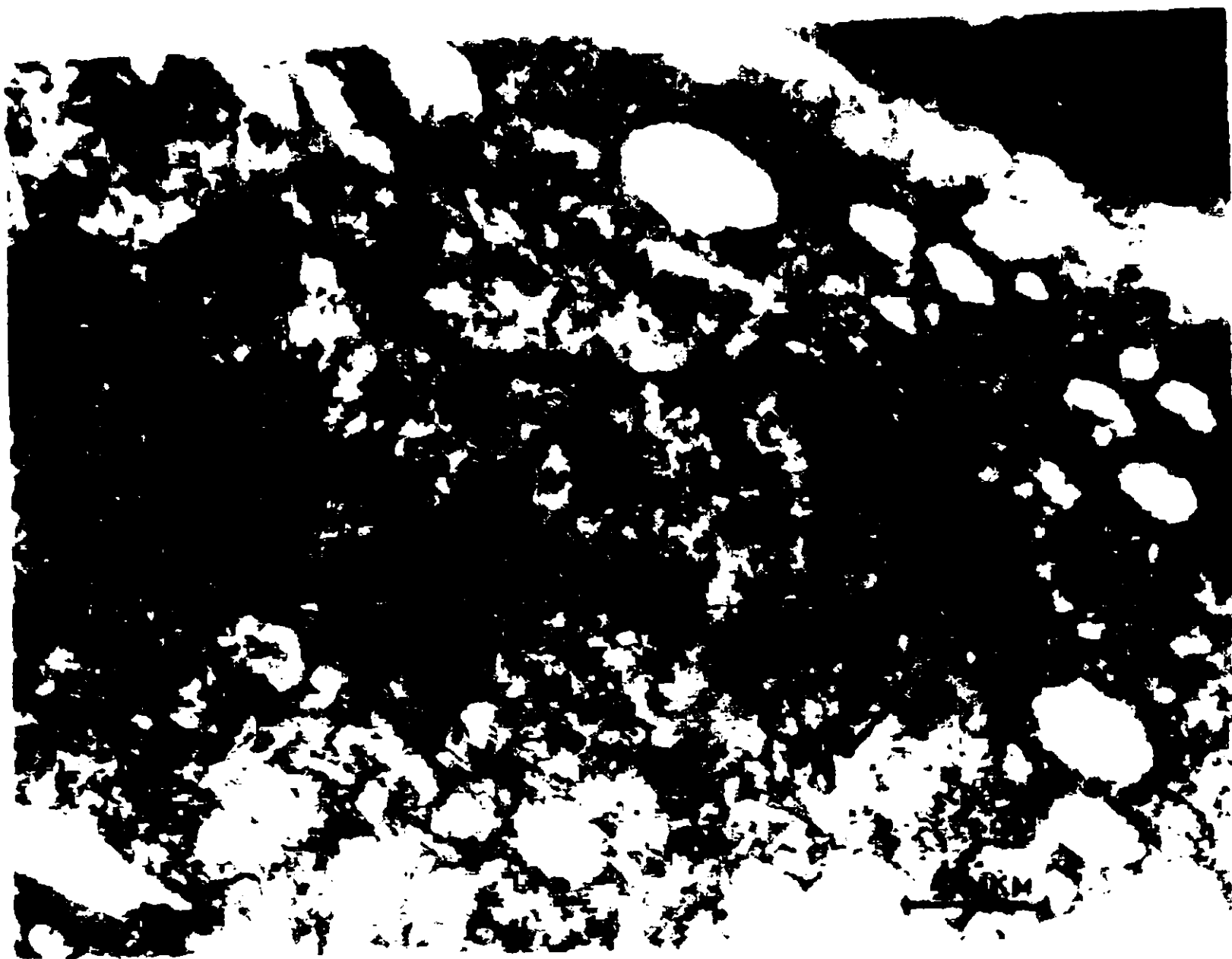


Рис. 5. Ультраструктура клетки гранулезы фолликула преовуляторного осетра. АЭР - агранулярный эндоплазматический ретикулум, ГЭР - гранулярный эндоплазматический ретикулум, Л - липиды, МХ - митохондрии, Я - ядро. Увел. 12000х.

клеточной поверхности, сходных с описанными для секреторных элементов (рис. 3в)

Обсуждение

В настоящее время показано участие половых стероидных гормонов в регуляции дифференцировки пола у рыб, с которым связано становление половой структуры популяции (Satoh, 1974; Hurk, Slof, 1981; Hurk et al., 1982; Guraya, 1994; Ахундов и др., 1995). Клеточные источники этих гормонов - СК - выявлены либо незадолго до начала дифференцировки пола, как у стерляди (Бурлаков, 1997), либо непосредственно в этот период, как у черной молинезии (Hurk, 1974) и тилпии (Nakamura, Nagahama, 1985). Однако у радужной форели СК были описаны после определения пола (Hurk et al., 1982).

Клетки с характерной для СК ультраструктурой митохондрий и липидными включениями выявлены нами в индифферентный период развития гонад у форели. В отличие от описанных в литературе СК в гонадах и надпочечниках у взрослых рыб и наземных позвоночных (Васильева, 1980; Guraya, 1994), в СК у форели в этот период при наличии хорошо развитого ГЭР, АЭР выражен слабо. Известно, что развитие двух типов эндоплазматической сети в клетке идет одновременно - АЭР возникает на более поздних этапах клеточной дифференцировки за счет превращения в нее ГЭР при активации синтеза (Баранникова и др., 1983; Заварзин и др., 1992). Мы предположили, что это СК в процессе цитоморфологической дифференцировки. Впоследствии они развиваются в клетки, по строению сходные с СК в семенниках и яичниках радужной форели после определения пола. Однако, возможно, что в ходе сексуализации гонад происходит не дифференцировка, а замена одних стероидогенных элементов другими, как это предполагается у стерляди (Федоров и др., 1990; Семенов и др., 1997). Это приводит к появлению четких половых различий в составе и морфологии СК гонад в соответствии с полиморфизмом и полоспецифичностью гипофизарных гонадотропных гормонов (Бурлаков, 1997).

Электронно-микроскопически и ультрацитохимически показано, что именно клетки теки являются как гладкомышечными, так и стероидсекретирующими (т.е. сочетающими обе функции), несмотря на морфологически слабое развитие структур, характерных для СК, и на то, что продукт реакции при выявлении активности 3β -ГСДГ не обнаруживает четкой связи с определенными органоидами клетки. Так, общеизвестно, что для СК гонад позвоночных характерна чрезвычайная лабильность ультраструктур, которые сильно меняются в относительно короткие промежутки времени в процессе циклических перестроек гонад. В таких типичных СК, как интерстициальные клетки Лейдига семенников рыб и амфибий, также не развит АЭР, хорошо развит ГЭР, практически нет в цитоплазме липидных капель, сильно развиты митохондрии с трубчато-везикулярными кристами (Aoki et al., 1969; Guraya, 1994). Ультраструктура описанных нами клеток теки фолликулов яичников у осетра и севрюги свидетельствует об умеренном стероидогенезе. Наличие в клетках теки вышеописанных ультраструктур свидетельствует о том, что они являются мюидно-секреторными (МСК). Признаки МСК выражены у рыб, по-видимому, довольно рано, поскольку пучки мюфибрилл отмечены в СК яичника

осетровых рыб и в раннем онтогенезе, в период анатомической дифференцировки пола (Семенов, 1989, 1995). Подобное явление сочетания миоидной и секреторной функций описано также и для клеток юкстагломерулярного аппарата почки (Bajaj, 1979; Ковальчук, 1987) и предсердий млекопитающих (Румянцев, 1982; Кантэн, Жэнэ, 1986). Предполагается, что МСК, будучи особенно развиты у видов рыб с крупными яйцеклетками, богатыми желтком, являются мишенью действия нонапептидных нейрогормонов (НПГ) при овуляции (Поленов, Гарлов, 1989). Сокращаясь под влиянием НПГ (преимущественно изотокцина у костистых и окситоциноподобного НПГ у осетровых) эти клетки способствуют разрыву фолликула.

Таким образом, МСК теки фолликулов ооцитов в преовуляторный период у осетровых “умеренно” активны (признаки миоидной и стероидсекретирующей функций выражены в них слабо). Только лишь после овуляции обе формы активности в них морфологически ярко выражены (рис. 3в, г, д). Естественно, что в постовуляторных фолликулах в таких МСК особенно гипертрофированы структуры, связанные с мышечной функцией (мощные пучки миофиламентов в сокращенных клетках). На усиление же секреторной функции МСК после нереста указывает появление многочисленных вакуолей по периферии цитоплазмы и особенно - своеобразных макроапокриновых выростов на ее поверхности. Последние весьма сходны с секреторными макроапокриновыми выростами апикальной поверхности цитоплазмы, описанными на “первично-секреторных” элементах - клетках эпидимы в мозгу и нейрогипофизе у осетровых рыб (Hansen, 1971; Polenov, Garlov, 1973) и железистых клетках метааденогипофиза у горбуши (Гарлов, 1976). Количество таких выростов увеличивается при активации этих секреторных элементов (Polenov, Garlov, 1974). Более того, электронно-микроскопически, гистохимически и радиоиммунологически установлено, что у костистых рыб признаки стероидогенеза особенно выражены в клетках теки постовуляторных фолликулов, а у живородящих акул (*in vitro*) в этих же клетках - к концу “беременности” (Kagawa et al., 1983; Tsang, Callard, 1992). Активация миоидной функции МСК обеспечивается влиянием на них НПГ (Гарлов, 1971; Поленов, Гарлов, 1989), интенсивное поступление которых в кровоток происходит в момент овуляции и после нее. При этом НПГ, возможно, оказывают и более широкое влияние на стимулированные эндогенными гонадотропинами

эндокринные и метаболические функции овариальных фолликулов (Сироткин и др., 1987. Гарлов, Поленов, 1996)

В яичниках горбуши в период ската, когда половые клетки представлены ооцитами на стадии протоплазматического роста, стероидсекретирующими. по-видимому, являются клетки теки. По ультраструктуре они ближе к СК в яичниках радужной форели. И в тех и в других отмечено большое количество округлых митохондрий с трубчато-везикулярными кристами, мелкие одиночные липидные включения или полное их отсутствие и не обнаружено миофибрилл. Однако также как и МСК фолликулов яичника осетровых СК в яичниках горбуши могут образовывать макроапокриновые выступы. В заключение можно отметить следующее:

СК впервые выявляются в гонадах радужной форели незадолго до дифференцировки пола.

СК в яичнике молоди горбуши в период ската обнаруживают общее сходство в ультраструктуре с СК в яичнике радужной форели в возрасте 75 суток после вылупления.

Клетки теки фолликулов яичника осетровых являются МСК, т.е. действительно сочетают миоидную и стероидсекретирующую функции. Эти функции МСК ярко проявляются в постовуляторный период.

На примере указанных видов рассмотрены морфофункциональные особенности СК на трех важнейших этапах онтогенеза: СК в период дифференцировки пола, СК в гонадах молоди после определения пола и, наконец в гонадах половозрелых рыб в период нереста.

Продолжение исследований в сравнительном эколого-гистофизиологическом направлении, разработанным профессором Н.Л. Гербильским (1972), перспективно как в теоретическом, так и в рыбохозяйственном аспектах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (Проект № 96-04-48964).

ЛИТЕРАТУРА

Ахундов М.М., Федорова К.Е., Касимов Р.КЮ. Развитие гонад у молоди персидского осетра, получавшей с пищей половые стероидные гормоны // Онтогенез 1995 .26, 170-173.

- Баранникова И.А. Гонадотропные и половые гормоны и их роль в регуляции функции воспроизводительной системы у пойкилотермных животных // Труды ВНИРО. 1975 СХД, 34-54.
- Баранникова И.А., Васильева Е.В., Дюбин В.П., Красноокеанская К.Д. Влияние гипофизэктомии, солевых и гормональных воздействий на состояние интерреналовой железы сибирского осетра // Цитология. 1983. 25, 168-175.
- Бурлаков А.Б. Половая специфичность гипофизарных гонадотропинов у карповых рыб. М.: Из-во МГУ. 1997, 208с.
- Васильева Е.В. Ультраструктура интерреналовой железы молоди белуги в пресной воде и в процессе солевой адаптации // Цитология. 1980. 22, 144-147.
- Гарлов П.Е. Эколого-гистофизиологическое исследование нейрогипофиза у русского осетра // Науч. сообщ. института биологии моря 1971. вып. 1, 52-59.
- Гарлов П.Е. Ультраструктурная организация нейропромежуточного комплекса гипофиза горбуши *Oncorhynchus gorbusha* (Walbaum) // ДАН СССР. 1976. 231, 208-211.
- Гарлов П.Е., Мосягина М.В. Структура и функция миоидно-секреторных (стероидсекретирующих) клеток теки фолликулов яичника осетровых рыб в период нереста // Цитология. 1998. 40, 502-513.
- Гарлов П.Е., Поленов А.Л. Функциональная цитоморфология преоптико-гипофизарной нейросекреторной системы рыб // Цитология. 1996 38, 275-299.
- Гербицкий Н.Л. Теория биологического прогресса осетровых и ее применение в практике осетрового хозяйства // В Сб. "Осетровые и проблемы осетрового хозяйства". М.: Пищевая промышленность. 1972, 101-112.
- Заварзин А.А., Харазова А.Д., Молитвин М.Н. Биология клетки: общая цитология. СПб: Изд-во СПбГУ. 1991, 320 с.
- Захарова Н.И. Влияние рентгеновского облучения на развитие половых желез в раннем онтогенезе радужной форели // В кн. "Экология и гистофизиология размножения гидробионтов". Л. 1989, 90-107.
- Зеленников О.В. Ускорение и дифференциация оогенеза как форма адаптивной реакции репродуктивной системы рыб на кислотный стресс // ДАН. 1996. 346, 570-572.
- Кантэн М., Жэнэ Ж. Сердце как эндокринная железа // В мире науки. 1986. 40-46.
- Ковальчук Л.Е. Ультраструктура юкстагломерулярного аппарата почки и периполярных клеток у прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) // Арх. анат. гистол. эмбриол. 1987. 93, 93-98.
- Мосягина М.В. Стероидсекретирующие клетки в гонадах радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) в период дифференцировки пола // Цитология

- Поленов А.Л. Гипоталамический контроль процессов размножения у рыб // Труды ВНИРО. 1975 СХІ, 54-68.
- Поленов А.Л., Гарлов П.Е. О миоидно-секреторных (стероидогенных) клетках соединительнотканной оболочки (теки) фолликулов яичника половозрелых осетровых рыб // Цитология. 1989. 31, 161-168.
- Румянцев П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации Л. Наука. 1982, 288с.
- Семенов В.В. Возможное происхождение, структура и локализация стероид-секретирующих клеток в яичнике молоди осетровых рыб // Цитология. 1989. 31, 34-41.
- Семенов В.В. Пополнение фонда половых и секреторных клеток в гонадах половозрелых самок русского осетра *Acipenser gueldenstaedti* // Вопр ихтиол. 1995. 35, 487-495.
- Семенов В.В., Федоров К.Е., Ахундов М.М. Ультраструктурный анализ закладки и половой дифференцировки гонад у стерляди и ленского осетра // Труды БиНИИ СПбГУ 1997. вып.44, 7-17.
- Сироткин А.В., Поленов А.Л., Гарлов П.Е. Участие нонапептидных гормонов в регуляции репродуктивной функции животных // "Итоги науки и техники", М. Изд. ГКНТ, ВИНТИЦ, АН СССР. 1987. "Нейроэндокринные механизмы воспроизводства диких и сельскохозяйственных животных". 1987. 15, 21-30.
- Федоров К.Е., Зубова С.Э., Семенов В.В., Бурлаков А.Б. Секреторные клетки в гонадах молоди стерляди, *Acipenser ruthenus* L в период дифференцировки пола // Вопр. ихтиол. 1990. 30, 65-75.
- Aoki A., Vitale-Calpe R., Armando P. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscumaculatus* // Z. Zellforsch. 1969. 98, 9-16.
- Baraias L. Anatomy of the uxtaglomerular apparatus // Amer. J. Physiol. 1979. 237, 333-343.
- Berchtold J.P. Ultracytochemical demonstration and probable localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity with a ferricyanide technique // Histochemistry. 1977. 50, 175-190.
- Dodd J.M. The endocrine regulation of gametogenesis and gonad maturation in fishes // Gen. Compar. Endocrinol. 1972. Suppl. 3, 675-687.
- Donaldson E.M. Reproductive endocrinology of fishes // Amer. Zool. 1973. 13, 909-931.
- Guraya S.S. Gonadal development and production of gametes in fish // Proc. Indian Acad. Sci. B. 1994. 60, 15-32.
- Hansen G.N. On the structure and vascularization of the pituitary gland in some primitive Actinopterygians (*Acipenser*, *Polyodon*, *Calamoichthys*, *Polypterus*, *Lepisosteus* and *Amia*) // Det Kongelige Danske Videnskabernes

Seskab Biologiske Skifter. Kobenhavn: Bianco Lunos Bogtrykkeri A/S
1971. 18, 1-64

- Hoar W.S., Randall D.J.* Fish physiology. 1969. N.-Y., London.: Acad. Presss. 2, 444 p.
- Hurk R. van den, Slof G.A.* A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* // Cell Tissue Res. 1981. 218, 487-497.
- Hurk R. van den, Lambert J.G.D., Peute J.* Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation // Reprod. nutr. develop. 1982. 22, 413-425.
- Idler D.R.* Steroidogenesis in fish // Fish research. 1969. N.-Y.: Acad. Press, 121-133.
- Kagawa H., Young G., Nagahama Y.* Relation between seasonal plasma estradiol-17 and testosterone levels and in vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // Biol. Reprod. 1983. 29, 301-309.
- Nakamura M., Nagahama Y.* Steroid producing cells during ovarian differentiation of tilapia, *Sarotherodon niloticus* // Dev. Growth Differ. 1985. 25. 701-708.
- Polenov A.L., Garlov P.E.* The hypothalamo-hypophysial system in Acipenseridae. III. The Neurohypophysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt and *Acipenser stellatus* Pallas // Z. Zellforsch. 1973. 136, 461-477.
- Polenov A.L., Garlov P.E.* The hypothalamo-hypophysial system in Acipenseridae. IV. The functional morphology of the neurohypophysis of *Acipenser gueldenstaedti* Brandt and *Acipenser stellatus* Pallas after exposure to different salinities // Cell Tissue Res. 1974. 148, 259-275.
- Satoh N.* An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes* // J. Embriol. Exp. Morphol. 1974. 32, 195-215.
- Tsang P.C.W., Callard I.P.* Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro in the viviparous shark, *Squalus acanthias* // J. Exp. Zool. 1992. 261, 97-104.

**СТАНОВЛЕНИЕ ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДАЛЬНЫХ
ВЗАИМОСВЯЗЕЙ У РЫБ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

Биологический факультет МГУ, Биологический институт СПбГУ

Гормональная регуляция самых ранних фаз развития половых желез у рыб является актуальным и пока еще мало изученным аспектом репродуктивной физиологии (Picford, Atz, 1957; Reinboth, 1972; Персов, 1975; Бурлаков и др., 1985; Федоров, 1989; Федоров и др., 1990; Fedorov et al., 1995; Ахундов, 1997; Бурлаков, 1997 и др.). Вопрос о гормональной детерминации начала гамето- и гонадогенеза у рыб, имеющий важное теоретическое и практическое значение, тесно связан с проблемами дифференцировки пола и формированием резервного фонда половых клеток, поскольку пластичность развития половых желез во многом определяет надежность дальнейшего воспроизводства и существования популяций в неблагоприятных условиях среды.

Хотя у позвоночных животных пол будущей особи определяется генетически еще при оплодотворении, морфологически у зародыша закладываются все эмбриональные структуры, необходимые для обоих полов, и они существуют в течение некоторого времени на ранних стадиях эмбриогенеза в виде отдельных зачатков. Такая "индифферентная" фаза наблюдается у каждой особи безотносительно к ее генетическому полу. Бисексуальность ранних зародышей обуславливает относительную легкость с которой происходит полная или частичная инверсия пола у особей, встречающаяся как аномалия развития у ряда видов в природе (при синхронном гермафродитизме), вызываемая экспериментально различными гормональными воздействиями, или закреплённая как характерное явление для ряда систематических групп рыб (при синхронном или онтогенетическом гермафродитизме).

Имеющиеся в настоящее время в литературе данные о характере определения пола у рыб свидетельствуют, что у них, как и у других низших позвоночных, "гетерохромосомный механизм находится на сравнительно низкой ступени эволюционного развития. По-видимому, в сумме факторов, контролирующих онтогенетическое становление признаков пола, генетические детерминанты пола у рыб и амфибий имеют относительно небольшой удельный вес" (цит по Астаурову,

1966, стр 108). Подтверждают это многочисленные случаи сравнительно легко осуществляемого процесса естественного и искусственного фенотипического переопределения пола у рыб под влиянием генотипической среды, гормональных и иных воздействий; факты существования разных типов становления пола (на основе мужской и женской гетерогаметности) у различных популяций в пределах одного вида, обнаруженные, в частности у пецилии и тиляпии; а также другие особенности механизма определения пола. Таким образом, рыбы в отношении механизмов определения пола представляют чрезвычайно гетерогенную группу организмов. У многих видов рыб, у которых половые хромосомы цитологически не выявляются, их наличие доказано генетически. В настоящее время из всех кариологически исследованных рыб (более 2000 видов) половые хромосомы были четко идентифицированы всего у 50 видов (Катасонов, Гомельский, 1991). Повидимому, у большинства раздельнополых рыб имеются цитологически неразличимые (изоморфные) половые хромосомы. Изоморфизм половых хромосом, а также наличие и мужской и женской гетерогаметности свидетельствуют об определенной лабильности полоопределяющих механизмов у рыб. Наглядным примером такой лабильности может служить эволюционно закрепившийся у ряда систематических групп рыб гермафродитизм, при котором действие генов, детерминирующих развитие мужских и женских признаков, находится в относительном равновесии. Программа развития этих признаков в онтогенезе определяется взаимодействием генотипа и среды через перестройку последовательных цепей гормональных регуляций в организме. Особо следует отметить, что хромосомный механизм детерминации пола с участием эндокринной регуляции способствует решению сразу двух жизненно важных задач: определяет и поддерживает на протяжении всего онтогенеза половую принадлежность особи, а также регулирует соотношение самок и самцов в потомстве (в популяции).

Низкая степень эволюционного развития гетерохромосомного механизма определения пола у рыб (в отличие от высших позвоночных) дает возможность изменять половую принадлежность особи в определенные моменты онтогенеза. Многочисленными опытами на разных видах рыб показана возможность инверсии пола при поступлении в организм в критический период половой дифференцировки гонад экзогенных половых стероидных (Ванякина, 1969; Гомельский, 1980; Ахундов, Федоров, 1994; Fedorov et al., 1995; Ахундов, 1997),

или гипофизарных гонадотропных гормонов (ГТГ) (Бурлаков и др., 1985, 1987; Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, 1997). Одновременно с этим появляются данные, свидетельствующие о том, что на этих критических гормонозависимых этапах сексуализации гонад у рыб под влиянием различных неблагоприятных экологических факторов (температура, соленость, химический состав воды, рН среды, дефицит пищи, фотопериод и др.) могут происходить функциональные, фенотипические инверсии, т.е. пересопределение детерминированного генотипом пола, причем как у видов, имеющих половые хромосомы, так и у видов без них (Rubin, 1985; Strussmann, Patino, 1995; Baroiller et al., 1996; Ивойлов, 1997; Ахундов, 1997). Необходимо отметить, что влияние факторов среды на детерминацию пола осуществляется под генетическим контролем (Conover, Kynard, 1981; Conover, Heins, 1987; Conover, 1992) через изменение гормонального статуса развивающегося организма (в первую очередь, вероятно, баланса половых стероидных гормонов). Это подтверждается наблюдением ряда авторов, отмечавших, например, зависимость от температуры воды синтеза и секреции половых стероидных гормонов, гонадотропин-релизинг-гормона (Mac Intyre et al., 1995), нейромедиаторов мозга (Trudeau, Peter, 1995), и гипофизарных ГТГ (Manning, Kime, 1984, цит. по: Годухин, Мотлах, 1992; Бурлаков, 1985; Pieau et al., 1987; Ахундов, 1997 и др.).

У рыб, в отличие от всех других позвоночных животных, выявлена половая специфичность гипофизарных ГТГ. Поэтому у рыб, как было показано на интактных и гипофизэктомированных особях, гипофизарные ГТГ, обладающие половой специфичностью, способны активно влиять на процессы дифференцировки гонады в соответствии со своей половой принадлежностью через изменение баланса половых стероидных гормонов (Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, 1997). Необходимость в появлении такой системы регуляции репродуктивной функции у самцов и самок рыб была связана, по-видимому, с большим разнообразием характера и способов размножения в разных систематических группах (существуют все переходы от простого икрометания до значительно более сложных форм вынашивания и живорождения). Только у рыб разнообразие в способах размножения (соответственно в морфологическом строении органов репродуктивной системы и физиологических особенностях регуляции этих процессов) значительно шире, чем у всех других позвоночных животных. Разнообразные ус-

ловия обитания, зависимость от температуры среды, а также от целого ряда других факторов, обусловило появление в эволюции у рыб целого ряда физиологических приспособлений (в том числе и в гормональной регуляции репродуктивной системы), позволяющих успешно адаптироваться к меняющимся условиям среды обитания. Одним из таких приспособлений в гормональной регуляции репродуктивной системы и является появление половой специфичности гипофизарных ГТГ, позволяющее четко регулировать специфичность прохождения разнообразных процессов у самцов и самок и обеспечивать огромную пластичность репродуктивной системы в целом как у отдельных видов, так и в различных систематических группах. Именно чрезвычайная пластичность такой регуляторной системы дает функциональную основу для закрепления в эволюции у отдельных систематических групп рыб различных форм гермафродитизма (синхронного и онтогенетического), открывает возможности осуществления плавных переходов от единовременного икрометания к порционному и обратно в зависимости от условий обитания, создает условия для регуляции численности потомства и соотношения в нем самцов и самок.

У теплокровных животных и особенно у млекопитающих зависимость нормального функционирования репродуктивной системы от условий среды значительно уменьшается. В связи с этим появляется возможность перехода к более простой и консервативной системе регуляции гипофизарными ГТГ (ЛГ и ФСГ) репродуктивной системы у самцов и самок - с помощью одних и тех же гормонов, но за счет разного характера их секреции (тонического у самцов и циклического у самок). Такая более жесткая консервативная система регуляции в значительной степени ограничивает пластичность репродуктивной системы у высших позвоночных.

В эволюции позвоночных животных именно у рыб впервые появляются в гипофизе два гонадотропных гормона, гомологичных ЛГ и ФСГ у высших позвоночных. Однако, существующая у рыб более высокая пластичность репродуктивной системы по сравнению с теплокровными животными, требует и более тонкой регуляции процессов в этой системе, что и обусловило появление разных ГТГ у самцов и самок. Более сложные взаимоотношения, по-видимому, возникают и в сферах регуляторных связей самих ГТГ-I и ГТГ-II у рыб. Они появляются в гипофизе в разные периоды онтогенеза и участвуют в регуляции разных процессов, например: ГТГ-I - дифференцировка по-

да, регуляция развития соматических элементов гонады, преимущественное влияние на сперматогенез, функциональная стерилизация гонад и т.д., ГТГ-II - деление и развитие половых клеток, регуляция вителлогенеза, созревания и овуляции ооцитов, спермация и т.д. (Бурлаков, 1997).

Изучение становления гонадотропной функции в раннем онтогенезе карпообразных показало, что образование гипофиза начинается через 7-8 часов после вылупления зародыша. Первые базофильные клетки появляются у толстолобика в возрасте 17-21 дня, когда мальки находятся на III этапе развития. На границе про- и мезоаденогипофиза, а также вдоль корней нейрогипофиза, появляются клетки, ярко окрашивающиеся паральдегид-фуксинем и реактивом Шиффа, имеющие характерную угловато-треугольную форму и четко оконтуренные ядра. По всем признакам они напоминают тиреотропные клетки. Первичные половые клетки, как известно, появляются в гонаде у личинок в возрасте 5-8 суток. После месячного возраста в гонадах мальков идентифицируется уже большое количество первичных половых клеток. Одновременно в гипофизе (у мальков в возрасте 26-30 дней) появляются базофильные клетки более округлой формы, располагающиеся в 1-3 ряда в вентральной и дорзальной периферических частях мезоаденогипофиза. Они имеют небольшие размеры, удлиненную форму, хорошо оконтуренное ядро и цитоплазму, заполненную большим количеством интенсивно окрашивающихся гранул. Они представляют собой периферические гонадотропоциты. Вслед за ними через несколько дней появляются базофильные клетки и в центральной части мезоаденогипофиза (центральные гонадотропоциты). Они располагаются диффузно по всей зоне мезоаденогипофиза. Это мелкие, неправильной формы клетки, с не большими, плохо оконтуренными ядрами и очень тонко гранулированной цитоплазмой. У мальков 40-45-дневного возраста в аденогипофизе заканчивается цитологическая дифференцировка гонадотропоцитов и уже четко выявляются три типа функционально активных базофильных клеток: тиреотропоциты, периферические и центральные гонадотропоциты. Окончательное морфологическое формирование гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы наблюдается у исследованных карпообразных видов до начала дифференцировки пола в гонадах: у карпа и толстолобика в возрасте 2-2,5 месяца (в условиях Ташкентской обл.), а у большегого буффало (в условиях Молдавии) ранее 5 месяцев (дифферен-

цировка пола у этих видов начинается соответственно в 3,5 и 4-4,5 месяца) Изучение содержания ГТГ в гипофизах толстолобика при подготовке и прохождении дифференцировки пола в гонадах с помощью диск-элек-трофореза в полиакриламидном геле с последующим биологическим тестированием выделенных фракций показало, что оба ГТГ (ГТГ-I и ГТГ-II) появляются в гипофизе в небольших количествах до начала анатомической дифференцировки пола, а во время цитологической дифференцировки их содержание резко возрастает (табл. 1).

Таблица 1.

Содержание ГТГ в гипофизе толстолобика в период дифференцировки пола ($M \pm m$)

Стадии развития гонад	Содержание ГТГ (МЕ/мг)		Соотношение ГТГ-I / ГТГ-II
	ГТГ-I	ГТГ-II	
Индифферентная гонада	0,50 \pm 0,02	0,20 \pm 0,003	2,5
Цитологическая дифференцировка	3,85 \pm 0,07	0,10 \pm 0,002	38,5
После окончания цитологической дифференцировки	1,45 \pm 0,05	0,28 \pm 0,003	5,18

Об определенной роли гипофизарных ГТГ в регуляции ранних фаз развития половых клеток можно судить и по другим критериям. Наиболее отчетливо такое влияние проявляется в начале дифференцировки пола. Показано, даже что в начале анатомической дифференцировки пола у осетровых рыб гипофизарные ГТГ (введение экстракта гипофиза) активно влияют на митотическую активность гоний (Зубова, 1976, 1978). Поскольку нами на гипофизэктомированной севрюге показано, что митотическую активность гоний активно стимулирует введение только высокогликозилированного ГТГ-II (Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, 1997), можно заключить, что ГТГ-II секретируется в кровь гипофизом осетровых уже в начале анатомической дифференцировки пола. Кроме этого подтверждением данного заключения служит и выявленная нами с помощью аналитического диск-электрофореза в полиакриламидном геле незначительная биологическая активность как ГТГ-I, так и ГТГ-II в гипофизе севрюги в это время в соотношении ГТГ-I / ГТГ-II = 8,5 : 1,2. Наконец, прямым подтверждением определенной функциональной роли гипофизарных ГТГ в регуляции дифференцировки пола служат опыты на гипофизэктомированной

до начала анатомической дифференцировки пола севрюге с последующим введением разных гипофизарных ГТГ, показавших, что ГТГ-1 стимулирует дифференцировку гонад в соответствии со своей половой принадлежностью, вызывая инверсию пола у особей с генетически противоположным полом (Федоров, Бурлаков, 1993; Бурлаков, 1997). Следует заметить, что в нормальном развитии рыб, амфибий и ряда высших позвоночных пол гонады первоначально определяется генетически, а не секрецией гипофизарных ГТГ, поскольку ранняя декапитация зародыша или гипофизэктомия не предотвращает половую дифференцировку его гонад, которая и осуществляется в соответствии с генетическим полом (Chin ve Chang, 1955; Зубова, 1976, 1978; Левина, 1974; Fedorov et al., 1995; Бурлаков, 1997).

Проведенный сравнительный анализ функциональной значимости гипофизарных и гонадальных стероидных гормонов в регуляции сексуализации гонад у осетровых и карповых рыб показывает, что половые стероидные гормоны, по-видимому, не являются первичными индукторами половой дифференцировки гонад, поскольку:

1 - половой статус стероидных гормонов в крови устанавливается после прохождения цитологической дифференцировки гонад,

2 - половые различия в составе стероидсекретирующих клеток в гонадах выявляются только во время начала цитологической дифференцировки гонад (раньше, чем по количественному содержанию половых стероидных гормонов в крови);

3 - фенотипическая инверсия пола под влиянием половых стероидных гормонов возможна только в присутствии гипофизарных ГТГ.

В отличие от этого, гипофизарным ГТГ принадлежит ведущая роль в индукции половой дифференцировки гонад, поскольку:

1 - их половой статус в гипофизе устанавливается несколько раньше начала анатомической дифференцировки гонад;

2 - у гипофизэктомированных рыб фенотипическая инверсия пола в период сексуализации гонад происходит строго в соответствии с половой принадлежностью вводимого гипофизарного ГТГ,

3 - полоспецифические гипофизарные ГТГ регулируют синтез и секрецию половых стероидных гормонов в гонадах, определяя специфику их содержания и соотношения в крови у особей разного пола не только в период дифференцировки пола, но и на всех последующих этапах онтогенеза.

Таким образом, при дифференцировке пола происходит не только анатомическая и цитологическая дифференцировка гонады, но и переключение на гуморальный способ обеспечения половых различий в организме за счет соответствующей дифференцировки и осуществления регуляции во всех звеньях гипоталамо-гипофизарно-гонадной нейросекреторной системы, включая и центральное его звено - гипофиз, путем включения в общую регуляторную цепь ГТГ, обладающих половой специфичностью. С помощью этих гипофизарных гормонов у рыб осуществляется регуляция не только дифференцировки гонад, но и поддержание половой специфичности различных процессов, протекающих в организме самцов и самок, на протяжении всего онтогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Ахундов М.М. Пластичность дифференцировки пола у осетровых рыб // Баку: Из-во Элм. 1997, 200 с.
- Ахундов М.М., Федоров К.Е. Влияние экзогенного эстрадиола на формирование яичников у молоди стерляди *Acipenser ruthenus* // Вопр. ихтиологии. 1994. 34, 557-563.
- Бурлаков А.Б. Активность гонадотропинов в гипофизе и сыворотке крови самок толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.) (Cyprinidae) на разных этапах репродуктивного цикла // Вопр.ихтиологии. 1985. 25, 494-504.
- Бурлаков А.Б. Половая специфичность гипофизарных гонадотропинов у икрומечущих рыб // М.: Из-во МГУ. 1997, 208с.
- Бурлаков А.Б., Федоров К.Е., Зубова С.Э. Изменение соотношения полов у молоди стерляди под воздействием гипофизарных полоспецифических гонадотропинов осетра, обладающих малой электрофоретической подвижностью // Докл.АН СССР, 1985. 285, 503-505.
- Бурлаков А.Б., Федоров К.Е., Зубова С.Э. Способ увеличения численности осетровых рыб//Авторское свидетельство. 1987. № 1305913.- Бюл.15 опубликован 21.04.87.
- Ванякина Е.Д. 1969. Генетика определения пола и некоторые вопросы гормональной регуляции пола у костистых рыб (литературный обзор) // Генетика, селекция и гибридизация рыб. М.: Наука, 29-44.
- Вундер П.А. Эндокринология пола. М.: Наука. 1980, 254 с.
- Гилберт С. Биология развития. Т.3. М.: Мир. 1995, 352 с.
- Годухин О.В., Мотлах И.Н. Регуляция гонадотропной функции гипофиза у костистых рыб //Успехи соврем. биол. 1992. 112, 115-129.
- Гомельский Б.И. Гормональное переопределение пола у рыб и возможности его применения в рыбоводстве // Генетика и селекция рыб. М. (Тру-

ды ВНИИПРХ). 1980. Вып. 28, 117-135.

- Зубова С.Э. Сроки дифференцировки гонад и соотношение самцов и самок у волжской стерляди *Acipenser ruthenus* // Вопр.ихтиологии. 1971. 11, 524-526.
- Зубова С.Э. Экспериментальный анализ раннего гаметогенеза и гонадо-гипофизарных связей в онтогенезе осетровых (на примере стерляди) // Автореф. дис. канд. биол. наук. 1976. ЛГУ, 20 с.
- Зубова С.Э. Гипофизарно-гонадные связи в раннем онтогенезе осетровых // Труды БиНИИ ЛГУ. 1978. 28, 126-141.
- Ивойлов А.А. Фенотипическая инверсия пола у самок мозамбикской тилляпии *Oreochromis mossambicus* (Peters) в результате применения некачественных кормов // Проблемы надежности функционирования репродуктивной системы у рыб. СПб.: Изд-во СПб ун-та. 1997, 74-76.
- Катасонов В.Я., Гомельский Б.И. Селекция рыб с основами генетики // М., Агропромиздат. 1991, 208 с.
- Левина С.Е. Очерки развития пола в раннем онтогенезе высших позвоночных // М.: Наука. 1974, 239 с.
- Персов Г.М. Дифференцировка пола у рыб. Л.: ЛГУ. 1975, 148 с.
- Розен В.Б. Основы эндокринологии. М. МГУ. 1994, 384 с.
- Семенов В.В., Федоров К.Е., Ахундов М.М. Ультраструктурный анализ закладки и половой дифференцировки гонад у стерляди и ленского осетра // Проблемы надежности функционирования репродуктивной системы у рыб. Труды Биол. НИИ СПб ун-та; Вып. 44, 1997, 7-17.
- Федоров К.Е. Гонадо-гипофизарные связи и дифференцировка пола у рыб. // Экология и гистофизиология размножения гидробионтов. Межвузовский сборник. Л., ЛГУ. 1989, 25-42.
- Федоров К.Е., Бурлаков А.Б. Влияние гипофизарных полоспецифических гонадотропинов осетра на дифференцировку гонад и уровень половых стероидных гормонов в крови молоди севрюги *Acipenser stellatus* // Ж. эвол. биохим. физиол. 1993. 29, 38-44.
- Федоров К.Е., Зубова С.Э., Семенов В.В., Бурлаков А.Б. Секреторные клетки в гонадах молоди стерляди, *Acipenser ruthenus* L., в период дифференцировки пола // Вопр.ихтиологии. 1990. 30, 65-75
- Baroiller J.F., Chourrout D., Fostier A., Jalabert B. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the monthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus* // J. Exp. Zool. 1996. 273, 216-233.
- Chin ve Chang. Hormonal influences on sex differentiation in the toad, *Bufo americanus* // Anat. Rec. 1955. 123, 467-487.
- Conover D.O. Seasonality and the scheduling of life history at different latitudes // J. Fish. Biol. 1992. 41 (Supplement B), 161-178.
- Conover D.O., Heins S.W. The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces, Atherinidae) // Copeia. 1987. 3, 732-743.

- Conover D.O., Kynard B.E.* Environmental sex determination interaction of temperature and genotype in a fish // *Science*. 1981, **213**, 577-579.
- Dufaur I* Feminisation de l'embryon male de Lezard vivipare (*Lacerta vivipara* Jacquin) par des gonadostimulines hypophysaires // *Compt. Rend. Acad. Sci.* 1965. **260**, 2319-2322.
- Fedorov K.E., Achundov M.M., Burlakov A.B.* Gameto- and gonadotropic effects of sex steroid and pituitary gonadotropins in early ontogenesis of sturgeons.// *Proceeding of material international simposium on sturgeons*. M.: VNIRO. 1995, 81-91.
- Mac Inture J.K., Gamble R., Chickering T.W., Sower S.A., Tobet S.* Developmental relationship of neurons containing γ -aminobutyric acid to neurons containing gonadotropin-releasing hormone in the sea lamprey// *Amer. Zool.* 1995. **35**, 22.
- Pickford G.E., Atz J.W.* The physiology of the pituitary gland of fishes. New York: Zool. Soc. 1957, 613 p.
- Pieau C., Dorizzi M., Desvages G.* Une hypothese sur l'implication des hormones oestrogenes dans la differentiation sexuelle des gonades chez les Amphibiens, les Reptiles et les Oiseaux // *Assoc. des Physiol., Cinquante-cinquieme reunion, Bordeaux. J.Physiol.* 1987. **30A**. (Abstr).
- Raynaud A.* Effect of testosterone on the urogenital system of the slow-worm (*Anguis fragilis* L.) // *Arch. anat. microsc. et morphol. exptl.* 1970. **59**, 125-160.
- Reinboth R.* Hormonal control of the teleost ovary // *Amer. Zool.* 1972. **12**, 307-324.
- Risley P.L.* A comparison of effects of gonadotropic and sex hormones on the urogenital systems of juvenile terrapins // *J.Exptl. Zool.* 1941. **87**, 477-515.
- Rubin D.A.* Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei) // *Copeia*. 1985, 233-235.
- Strussmann C.A., Patifio R.* Temperature manipulation of sex didderentiation in fish // *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Ed. By F.W.Goets and P.Thomas). The University of Texas at Austin, Austin, Texas. U.S.A. 2-8 July 1995, 153-157.
- Trudeau V.L., Peter R.E.* Functional interrection between neuroendocrine systems regulating GTH-2 release // *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Ed. by F.W.Goets and P.Thomas). The University of Texas at Austin, Austin, Texas U.S A. 2-8 July 1995, 44-48.

**ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ
РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА МНОГОПОРЦИОННЫХ
РЫБ НА ПРИМЕРЕ АНЧОУСА ЧЕРНОГО И АЗОВСКОГО МОРЕЙ**

**Институт океанологии РАН, Москва,
Всероссийский научно-исследовательский институт морского рыбно-
го хозяйства и океанографии, Москва**

Репродуктивная система многих тепловодных рыб характеризуется недетерминированной плодовитостью и многопорционным нерестом (Овен, 1976). Непрерывный механизм созревания ооцитов придает таким рыбам высокую степень лабильности при формировании репродуктивного потенциала, возможность быстрого адекватного ответа на изменение внешних условий. Исследование количественных параметров размножения, их сезонной и межгодовой динамики были проведены на азово-черноморском анчоусе, характерном представителе многопорционных рыб. Материалом послужили сборы, выполненные на судах ВНИРО и ЮгНИРО в летний период 1987-1990 гг в Черном и в 1995-1996 гг в Азовском морях по единой методике. Эти исследования, проведенные сперва для черноморской, а затем и для азовской хамсы, показали значительную межгодовую изменчивость всех репродуктивных параметров и их жесткую зависимость от экологических факторов.

Температура воды является основным фактором, определяющим начало нереста - при достижении температуры в поверхностном слое 18°C (обычно в конце мая-начале июня) в уловах начинают появляться самки с гидратированной икрой, далее с повышением температуры воды доля таких самок в уловах постепенно растет, достигая к середине июля 100% (рис. 1). Однако даже в разгар нерестового сезона на отдельных участках наблюдались случаи полной остановки нереста хамсы при проникновении туда холодных водных масс с температурой ниже 18°C . Вероятно, достижение определенной температуры является необходимым условием для выживания и развития отложенной икры, поэтому локальное проникновение холодных течений вызывают немедленную приостановку нереста.

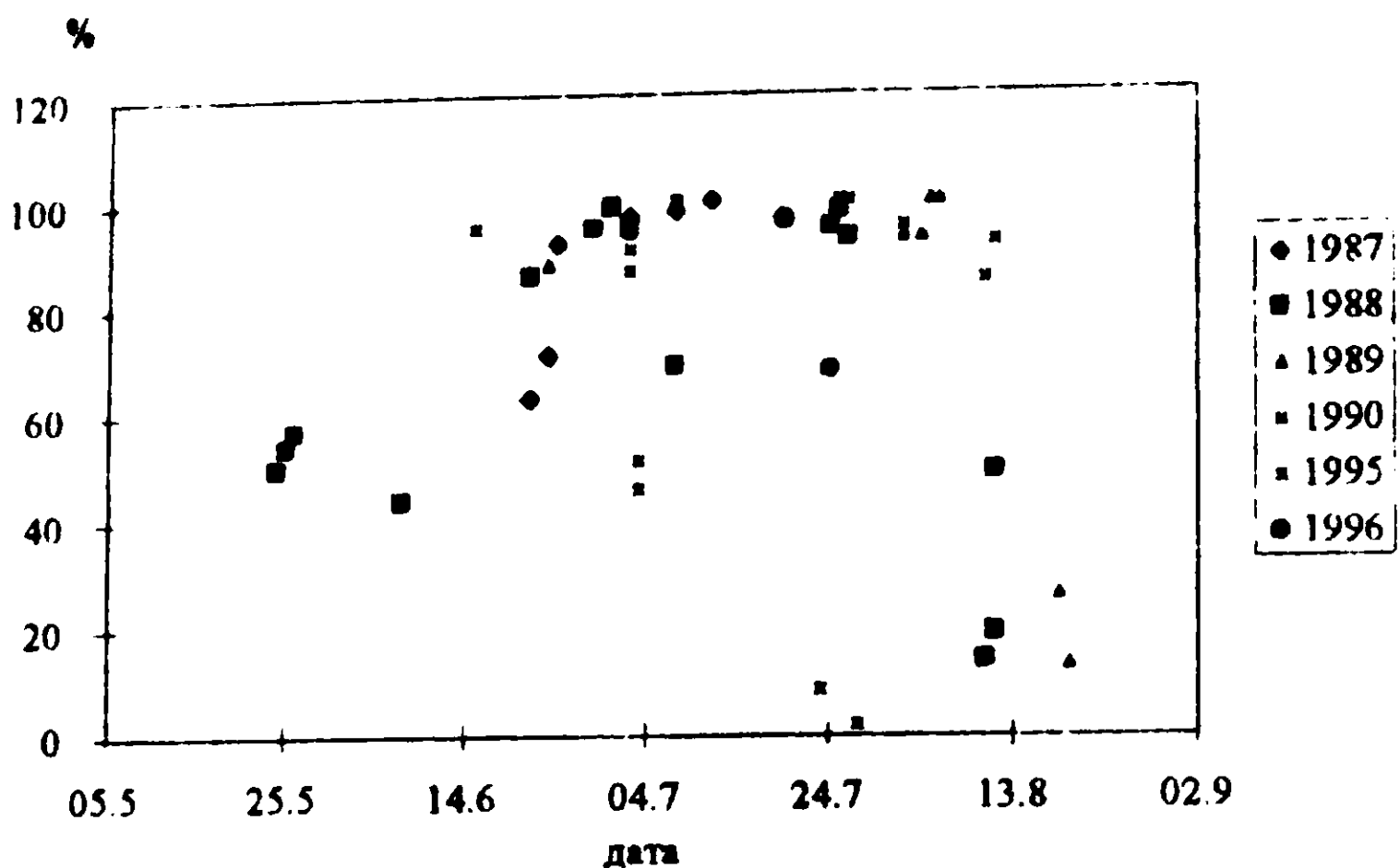


Рис. 1. Сезонная динамика доли ежедневно нерестящихся самок (%) в уловах черноморской (1987- 1990 гг.) и азовской (1995-96 гг.) хамсы.

Пока не ясно, как влияет изменение температуры на момент окончания нереста. Однако при сравнении данных, полученных в Черном и Азовском морях, можно видеть, что продолжительность нереста анчоуса в Азовском море на 3-4 недели меньше, чем в Черном (рис. 1). Данный факт можно объяснить тем, что более мелководное Азовское море значительно быстрее прогревается, и слишком высокая температура, возможно, также является сигналом к прекращению нереста. Не менее существенным фактором, оказывающим влияние на количественные репродуктивные параметры анчоуса, является состояние его кормовой базы. Годовые циклы этих рыб таковы, что период нереста (май-август) приходится на время, когда уровень содержания жира в теле минимален (Шульман, 1972; Шульман, Урденко, 1989; Лисовенко и др., 1998), поэтому энергетическое обеспечение каждого икрометания практически полностью определяется количеством потребленной накануне пищи.

Как видно на рис. 1-3, значительная межгодовая изменчивость наблюдается для всех количественных показателей нереста - доли ежедневно нерестящихся самок, относительной и абсолютной порционной плодовитости - как черноморского, так и азовского подвигов.

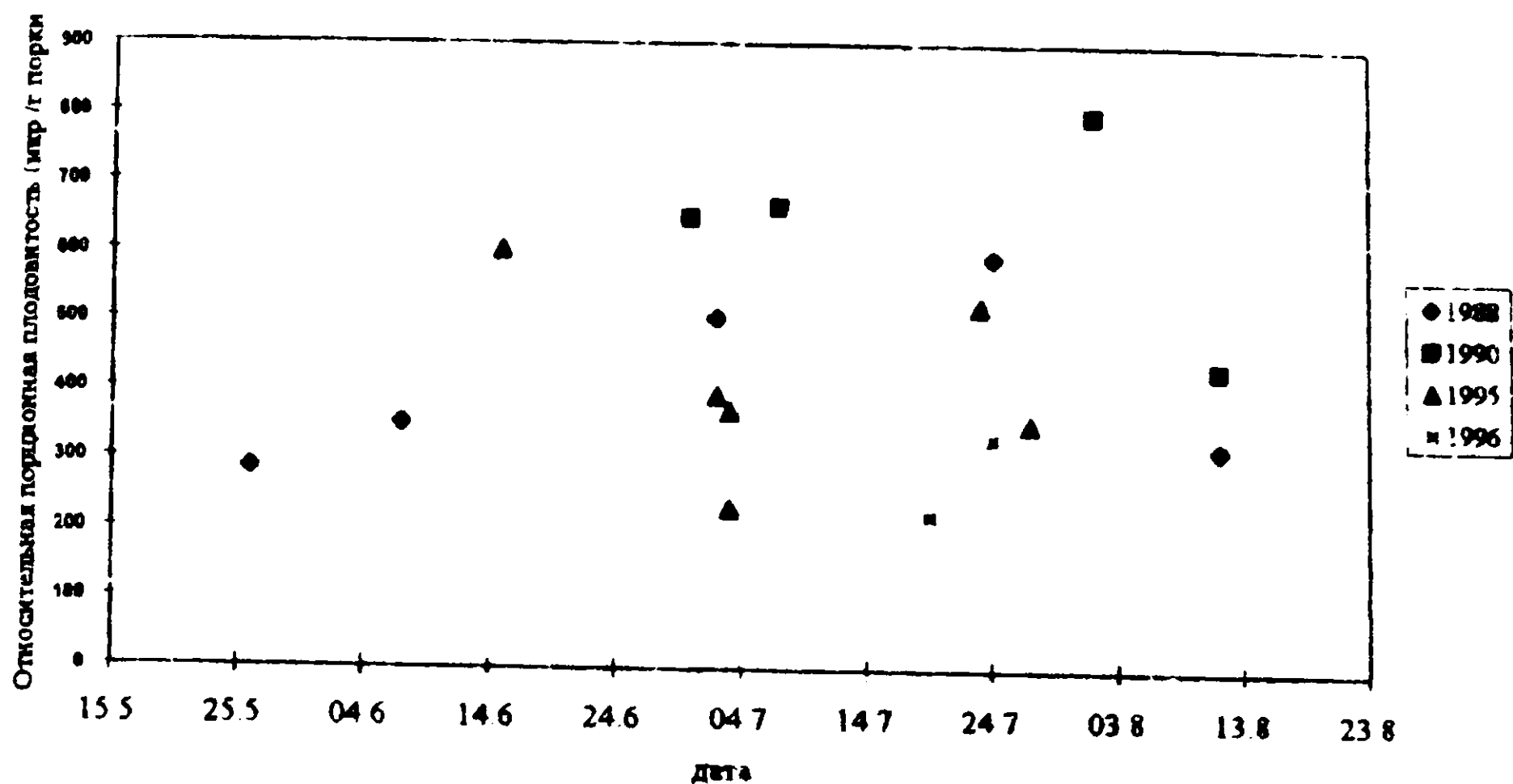


Рис. 2. Сезонная динамика относительной порционной плодовитости черноморской (1988 и 1990 гг.) и азовской (1995-96 гг.) хамсы.

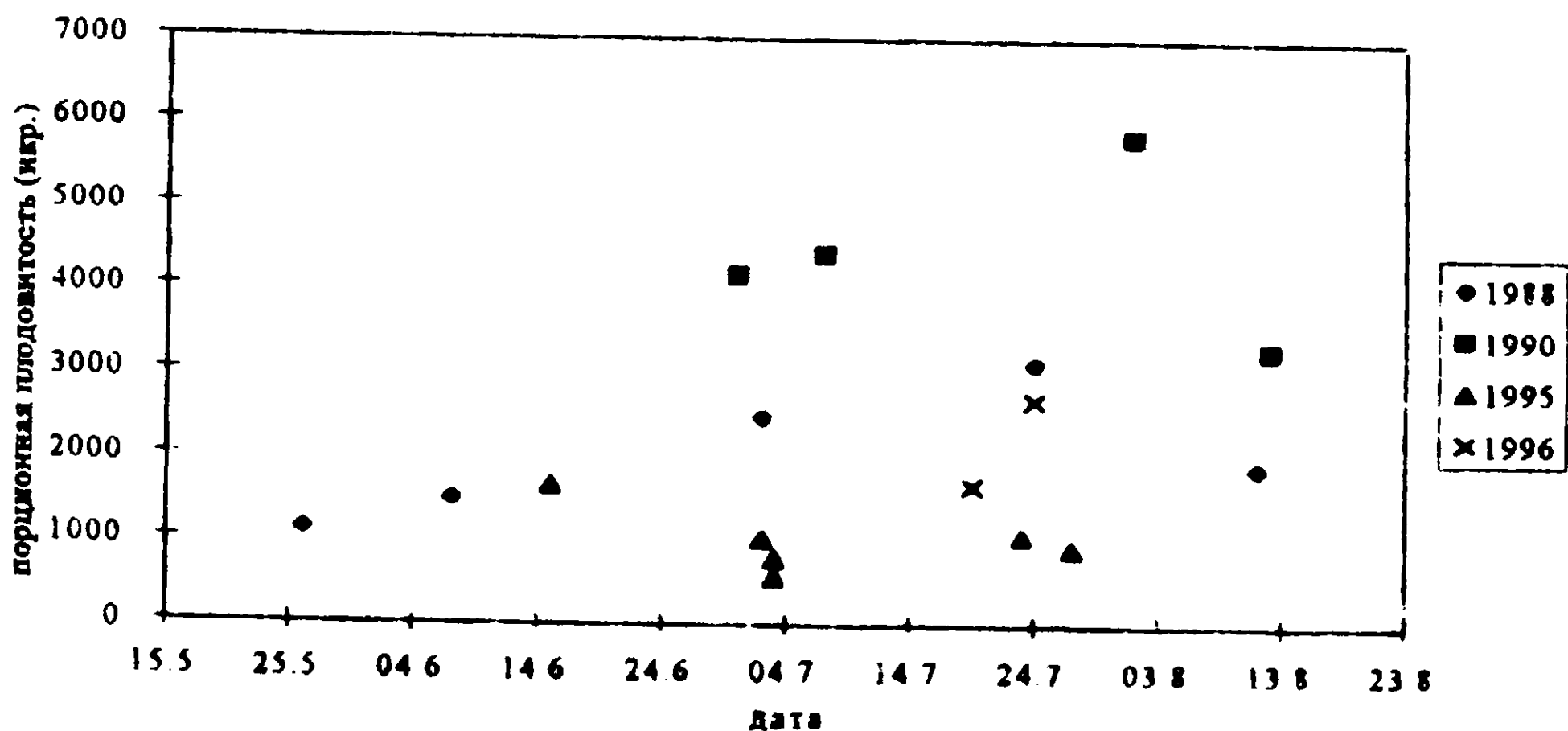


Рис. 3. Сезонная динамика величины порционной плодовитости черноморской (1988 и 1990 гг.) и азовской (1995-96 гг.) хамсы.

Например, 1988 год отличался необыкновенно низкой биомассой кормового планктона (Виноградов и др., 1992; 1995), соответственно

крайне низкими были и рационы анчоуса (рис. 4) - в 3-4 раза ниже, чем в другие годы исследований (Булгакова, 1992; Булгакова и др., 1997). Величины относительной и абсолютной порционной плодовитости в 1988 г. также были заметно ниже, чем в благоприятном для анчоуса в кормовом отношении 1990 г (рис. 2-3). Все это в итоге вызвало различие в величинах годовой плодовитости средней самки между этими двумя годами в 1,7 раза (Лисовенко и др., 1997).

Аналогичная картина наблюдалась и при дальнейших исследованиях на азовском анчоусе. В последние годы экологическая обстановка в Азовском море резко ухудшилась из-за проникновения в этот водоем и массового развития гребневика *Mnemiopsis leidyi* (Чащин и др., 1996). Биомасса кормового планктона снизилась, а его структура изменилась в сторону замещения высококалорийных *Soropoda*, излюбленного корма анчоуса и других планктоядных рыб, на личинок моллюсков, усоногих раков и остракод (Будниченко и др., 1998). В результате рационы азовского анчоуса летом 1995 и 1996 гг. на большинстве станций были низкими (рис. 4), калорийность их также снизилась, и суточные энергетические потребности хамсы удовлетворялись лишь на 30-50%. Как видно на рис. 2-3, величины относительной и абсолютной порционной плодовитости в течение всего нерестового сезона в оба эти года значительно ниже, чем наблюдались в любой из исследованных сезонов у черноморской хамсы.

Помимо прямого влияния интенсивности потребления пищи на репродуктивный потенциал анчоуса, существует и опосредованное, через снижение скорости роста и вследствие этого - размеров производителей. Поскольку величина порционной плодовитости прямо пропорциональна весу самки, то при снижении размеров производителей уменьшается и количество выметываемой икры. Кроме того, наблюдается связь между средними размерами самок и сроками окончания нереста. Так, в 1988 г. наблюдались минимальные для черноморского анчоуса размеры самок в уловах в течение всего нерестового сезона (рис. 5), при этом и нерест закончился преждевременно - уже к 10 августа доля нерестящихся самок снизилась менее чем до 20%. Аналогичная картина наблюдается при сравнении данных по азовскому анчоусу за 1995 и 1996 гг. Размеры рыб в 1995 г. были примерно в 3 раза выше, чем в 1996 (рис. 5), в результате уже 23-24 июля доля нерес-

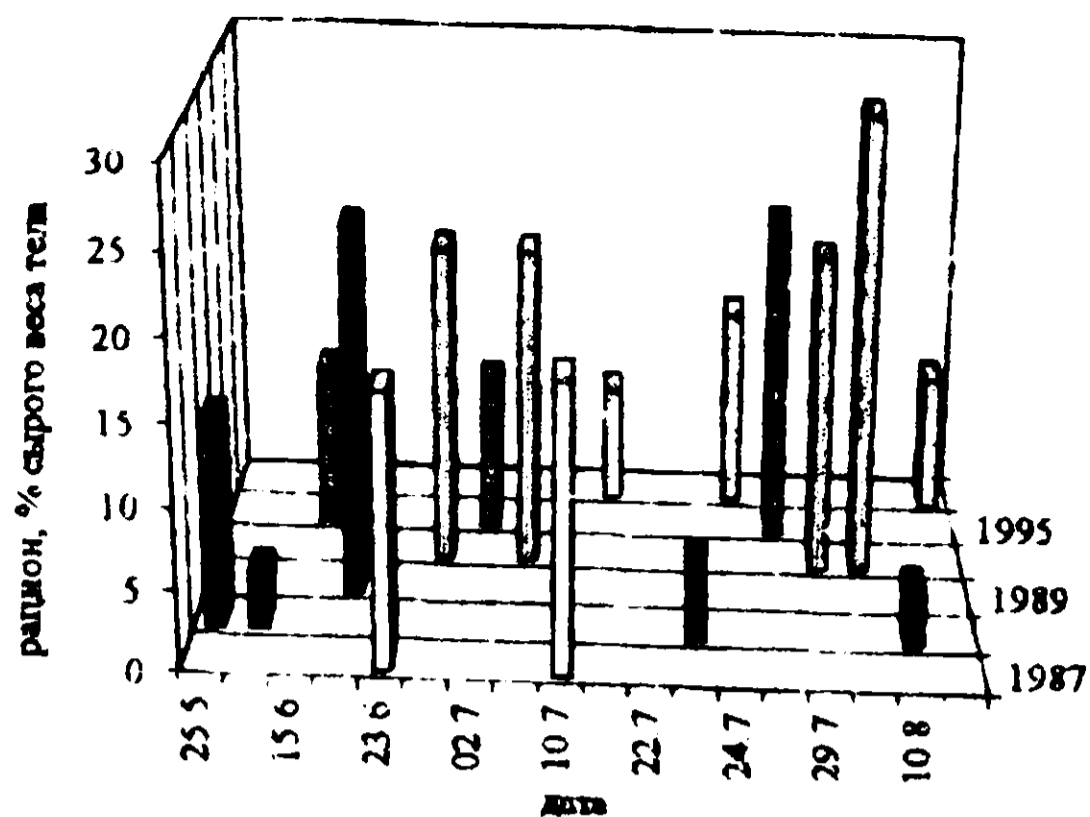


Рис. 4. Суточные рационы (%) самок черноморского (1987-1990 гг.) и азовско-го (1995-1996 гг.) анчоуса.

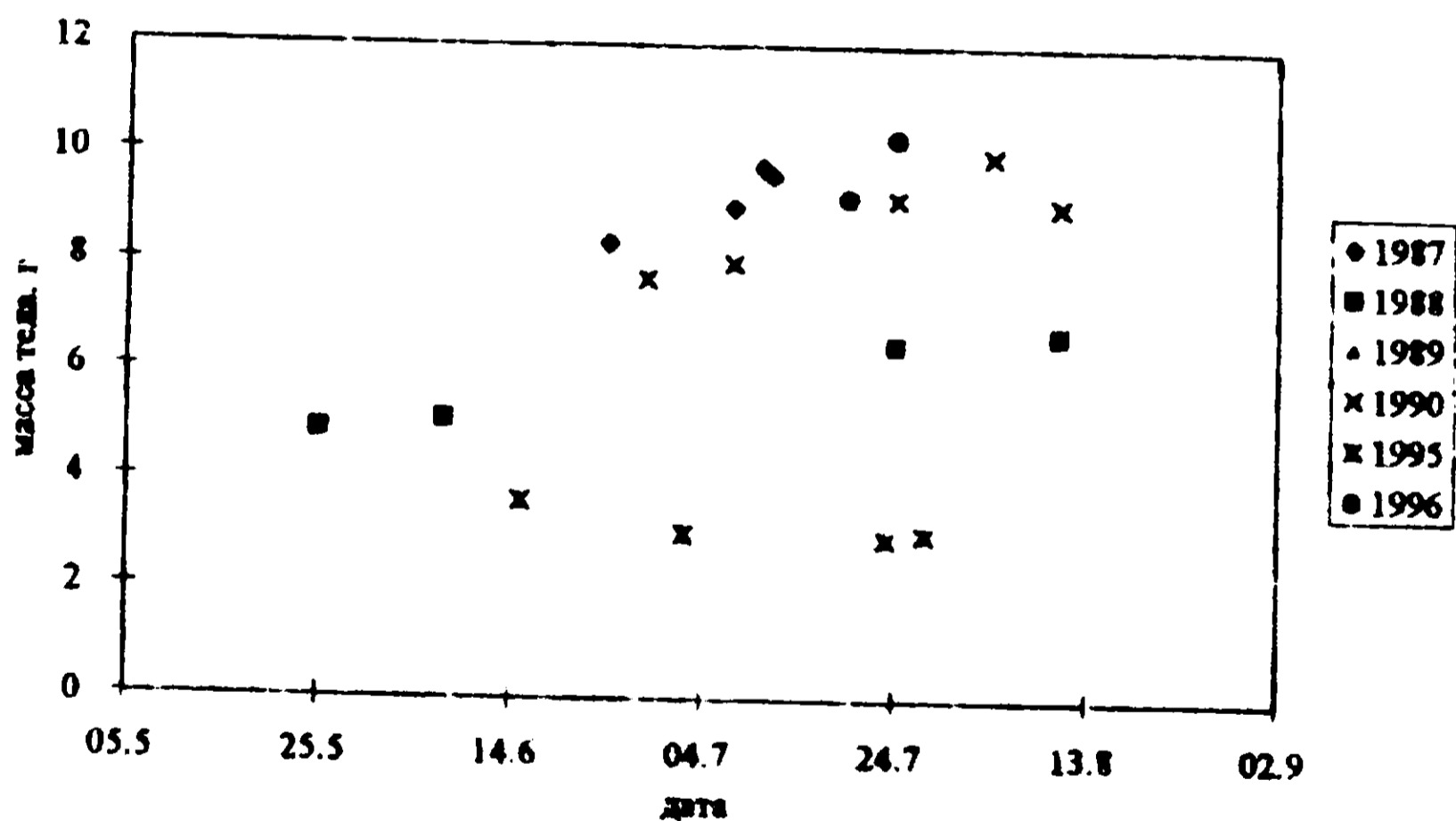


Рис. 5. Средняя масса самок черноморского (1987-1990 гг.) и азовского (1995-1996 гг.) анчоуса в уловах в период нереста.

стящихся самок составляла всего 2%, в то время как в тот же период 1996 г она достигала 96%.

Таким образом, основываясь на приведенном примере исследований количественных репродуктивных параметров азово-черноморского анчоуса, можно полагать, что у видов рыб с недетерминиро-

ванной плодовитостью и многопорционным нерестом степень реализации репродуктивного потенциала определяется конкретными условиями среды в конкретные годы. Это необходимо учитывать при оценке параметров размножения подобных рыб, расчётах запасов и прогнозировании вылова.

ЛИТЕРАТУРА

- Булгакова Ю.В. Интенсивность питания черноморской хамсы *Engraulis encrasicolus ponticus* в период нереста. // Вопр. ихтиол. 1992. 32, 168-171.
- Булгакова Ю.В., Андрианов Д.П., Лисовенко Л.А. Оценка интенсивности питания черноморской хамсы *Engraulis encrasicolus ponticus* // Вопр. ихтиол. 1997. 37, 653-659.
- Будниченко Э.В., Фирулина Ф.В., Булгакова Ю.В. Условия нагула азовской хамсы *Engraulis encrasicolus maeoticus* в летне-осенний период 1995-1996 гг. // Вопр. ихтиол. 1998. 38, в печати.
- Виноградов М.Е., Сапожников В.В., Шушкина Э.А. Экосистема Черного моря. // М.: Наука. 1992, 112 с.
- Виноградов М.Е., Шушкина Э.А., Булгакова Ю.В., Серобаба И.И. Потребление зоопланктона гребневиком *Mnemiopsis leidyi* и пелагическими рыбами в Черном море // Океанология. 1995. 35, 569-573.
- Лисовенко Л.А., Андрианов Д.П., Булгакова Ю.В. Экология размножения черноморской хамсы *Engraulis encrasicolus ponticus* 2. Количественные параметры нереста // Вопр. ихтиол. 1997. 37, 639-646.
- Лисовенко Л.А., Андрианов Д.П., Булгакова Ю.В., Сезонная динамика питания и жиронакопления у рыб с прерывистым и непрерывным оогенезом. // Тезисы докл. научной конференции по экологической физиологии рыб. Борок, 1998.
- Овен Л.С. Особенности оогенеза и характер нереста морских рыб. // Киев: Наукова думка. 1976, 132 с.
- Чащин А.К., Гришин А.Н., Дубовик В.Е., Патюк В.В. Межгодовая и сезонная динамика развития гребневика *Mnemiopsis leidyi* и его влияние на ресурсы пелагических рыб Азово-Черноморского бассейна. // Труды ЮгНИРО. 1996. 42, 200-206.
- Шульман Г.Е. 1972. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1972, 337 с.
- Шульман Г.Е., Урденко С.Ю. Продуктивность рыб Черного моря. // Киев, Наукова думка. 1989, 188 с.

**РАЗВИТИЕ ВКУСОВОЙ СИСТЕМЫ У РЯДА ВИДОВ ОСЕТРОВЫХ
РЫБ В СВЯЗИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ИХ ЭКОЛОГИИ.**

**Биологический факультет МГУ, Москва,
Институт физиологии АН Азербайджана, Баку.**

Вкусовой анализатор у позвоночных животных, по выражению П.К. Анохина, (1968), занимает особое положение среди сенсорных систем, являясь связующим звеном между внешней средой и внутренней средой организма, обеспечивая его нормальное питание и функционирование. У рыб, в связи с водной средой обитания, вкусовая система достигает значительно большего развития, чем у наземных позвоночных. Об этом свидетельствует наличие огромного количества вкусовых рецепторов не только в ротовой полости, но и на поверхности тела, а также наличие обособленного мозгового центра вкусовой доли, в частности, у представителей таких семейств как карповые и сомовые (Finger, 1983).

Осетровые рыбы обладают весьма чувствительной вкусовой рецепцией (Касумян и др., 1992). Вкусовая рецепция играет большую роль в поведении молоди осетровых рыб (Павлов и др., 1970) и особенно ранней молоди, поскольку в процессе онтогенеза другие сенсорные системы созревают морфологически и функционально значительно позже вкусовой (Девicina, Кажлаев, 1992). Вкусовой анализатор для молоди этих рыб важен не только как аппарат мотивации пищевого поведения, но и как развитая рефлексогенная зона, связанная с различного рода висцеральной сигнализацией. Особенно ярко проявляется это на ранних этапах онтогенеза, когда происходит формирование функциональных систем организма и его связей со средой обитания. Однако, особенности морфологии и функции вкусовой системы и формирования ее в процессе развития у осетровых рыб остается малоизученной областью сенсорной физиологии рыб.

Задачей настоящей работы было изучение динамики развития всей вкусовой системы в целом, включая ее центральные и периферические отделы, у ряда видов осетровых рыб. Объектами исследования

дования служили предличинки, личинки и мальки представителей рода *Acipenser* севрюга (*Acipenser stellatus*), русский осетр (*Acipenser gueldenstaedti*), сибирский осетр (*Acipenser baeri*), шип (*Acipenser nudi-ventris*), куринский осетр (*Acipenser persicus*), а также белуга (*Huso huso*) и веслонос (*Polyodon spathula*). Материал фиксировали через определенные интервалы времени и обрабатывали общепринятыми методами для приготовления гистологических препаратов и препаратов для электронной микроскопии.

Результаты наблюдений показали что вылупившиеся из икры свободные зародыши всех исследованных видов осетровых не имеют вкусовых рецепторов. Однако, в это время происходит развитие центральных отделов их вкусовой системы, в продолговатом мозге в зонах проекций V (n. trigeminus) и VII (n. facialis), IX (n. glossopharyngeus) и X (n. vagus) нервов. В литературе отсутствует описание цитоархитектоники продолговатого мозга осетровых рыб, в связи с чем мы приводим собственные данные, полученные на примере севрюги, сибирского, куринского осетров и шипа. Продолговатый мозг, начинаясь сразу позади ножек мозжечка, получает у осетровых рыб наиболее мощные, по сравнению с другими отделами мозга, сенсорные входы от крупных ганглиев V-VII, VIII и IX-X нервов. Сформированный продолговатый мозг имеет сходное строение у разных видов осетров. Это желоб с утолщенными валикообразными латеральными стенками, которые ограничивают полость IV мозгового желудочка (рис. 1А). Следует отметить, что все процессы дифференцировки центральных отделов вкусовой системы также протекают сходным образом у разных видов.

У предличинок в первые сутки после вылупления дифференцирующиеся нейроны обнаруживаются в области будущих проекций X нерва в каудальной части продолговатого мозга. В ростральном Prosencephalon выделяются дорзо-медиально зоны входа корешков V и VII нервов, где в это время происходят процессы активной пролиферации и миграции клеток, формирование связей этой мозговой зоны с ганглием. Основная же масса клеток мозга рядом со вкусовыми зонами имеет одинаковую овальную форму пронеуробластического типа по классификации О. В. Богданова (1978).

В ходе дальнейшего развития к возрасту 3-х - 4-х суток в локальных вкусовых зонах мозга наблюдается рост тел клеток и изменение их формы. Так, в зоне вкусовых проекций лицевого нерва клетки приобретают веретеновидную форму с двумя полярными отростками и

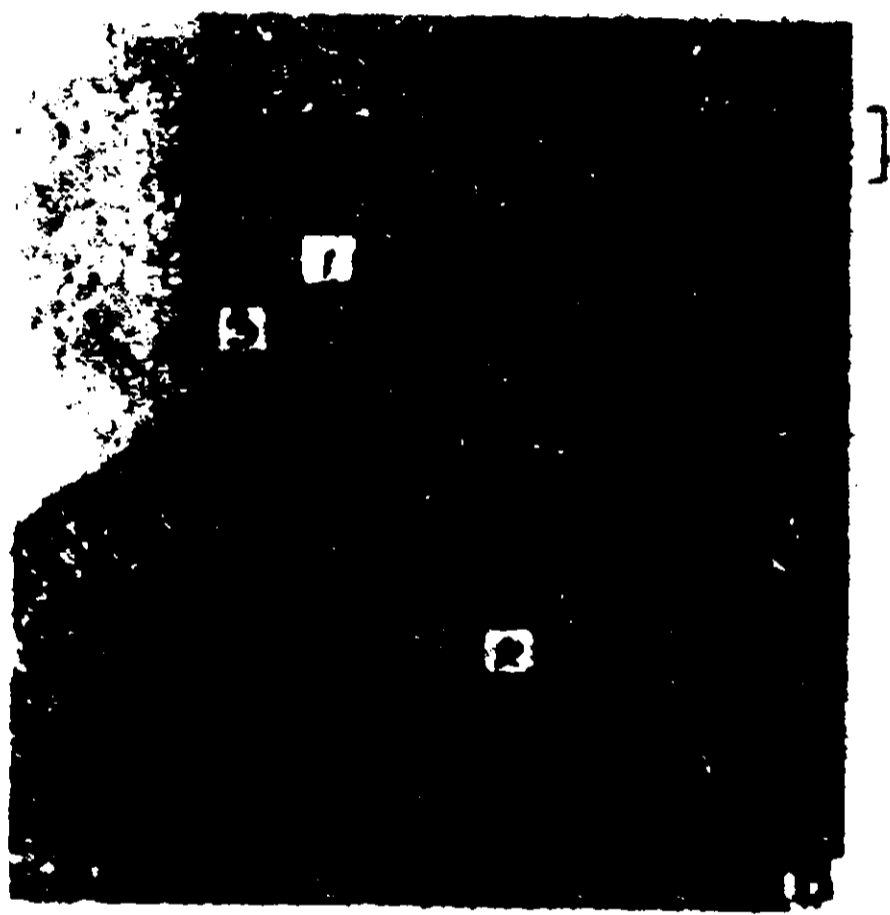
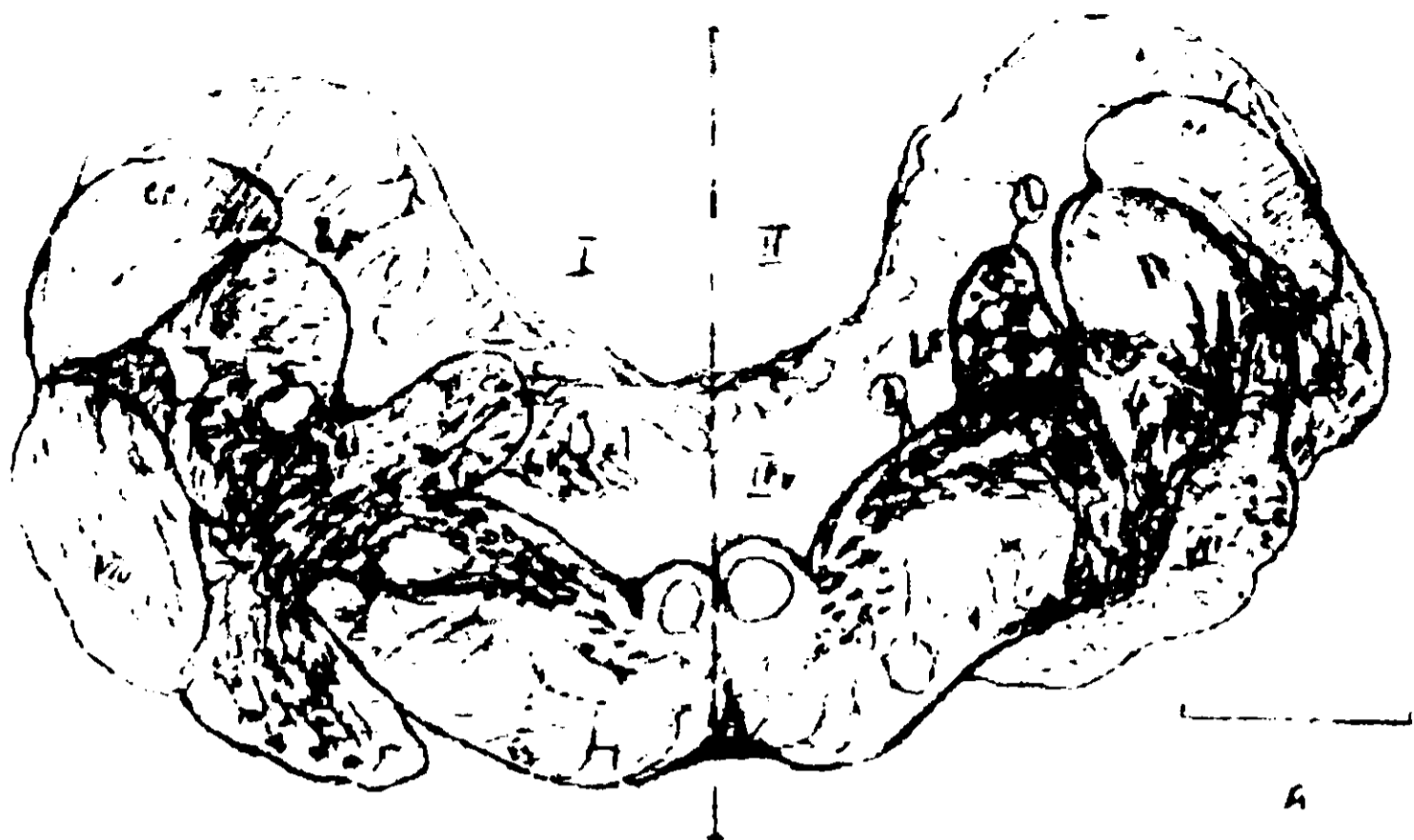


Рис. 1. Продолговатый мозг малька сибирского осетра (А) и поздней личинки шипа (Б) А- схема по гистологическим препаратам (калибровка 1мм), где I - каудальная область на уровне начала вагусной доли (LV), II - ростральная область на уровне начала фациальной доли (LF) Б- медио-базальная часть фациальной доли (калибровка 20мкм). 1 - сенсорные нейроны, 2- мотонейроны. 3 - глиальный слой, 4 - поперечный срез вторичного вкусового тракта, СС - Crista Cerebelli, IVv-полость 4-го мозгового желудочка.

проявляют признаки активного перемещения в латеральном и каудальном направлении. Одновременно происходит перераспределение кле-

ток по размерам в различные части этой зоны. Здесь в области входа корешков VII нерва обозначаются скопления сенсорных и моторных нейронов и формируются проводящие пути, вторичный вкусовой тракт, которые связывают данную зону с другими выше и ниже лежащими отделами (рис. 1Б). Возраст 5-7 суток после вылупления у севрюги, сибирского осетра, шипа, белуги соответствует началу смешанного питания, когда фациальная область мозга разрастается, анатомически превращаясь в дальнейшем в крупную парную фациальную долю (*Lobi facialis*). Последняя на поперечном срезе мозга представлена в виде парного дорзо-медиального выпуклого валика, тянущегося в каудальном направлении до начала вагусной зоны. Область первичных проекций блуждающего нерва у личинок этого возраста также имеет вид парных удлиненных валиков (*Lobi vagi*), в центре которых видны продольно идущие пучки нервных волокон и разноразмерные сенсорные нейроны, а вентральнее располагается скопление крупных моторных нейронов (рис. 1А).

Анализ динамики морфометрических показателей сенсорных нейронов в этих областях мозга личинок и мальков показал, что переход их на смешанное питание коррелирует со снижением ядерно-плазматического отношения в нейронах, а это соответствует по времени активному росту тел нейронов накануне появления первых вкусовых почек, что происходит как раз на первых этапах смешанного питания. В возрасте от 8 до 11 суток, а это переход на полное экзогенное питание, наблюдается быстрый рост объемов клеточных ядер в сенсорных нейронах как в лицевой доле, так и в вагусной, что свидетельствует о быстрой активации синтетических и ростовых процессов в нейронах вкусовых центров. У молоди в возрасте 11-18 суток этот показатель сохранялся на максимальном уровне, а затем снижался, достигая к возрасту 23 суток некоторого среднего уровня, который был в период смешанного питания (рис. 2А, Б). Таким образом, в личиночном периоде у исследованных видов осетровых рыб формируются центры вкусовой рецепции в виде фациальной и вагусной доли. При этом выявляется четко выраженный период метаболической, функциональной активации первичных сенсорных нейронов обоих вкусовых центров - период связанный с переходом личинок на полное экзогенное питание.

Дифференцировка вкусовых рецепторных структур у рыб начинается только после того, как аксоны соответствующих ганглиозных

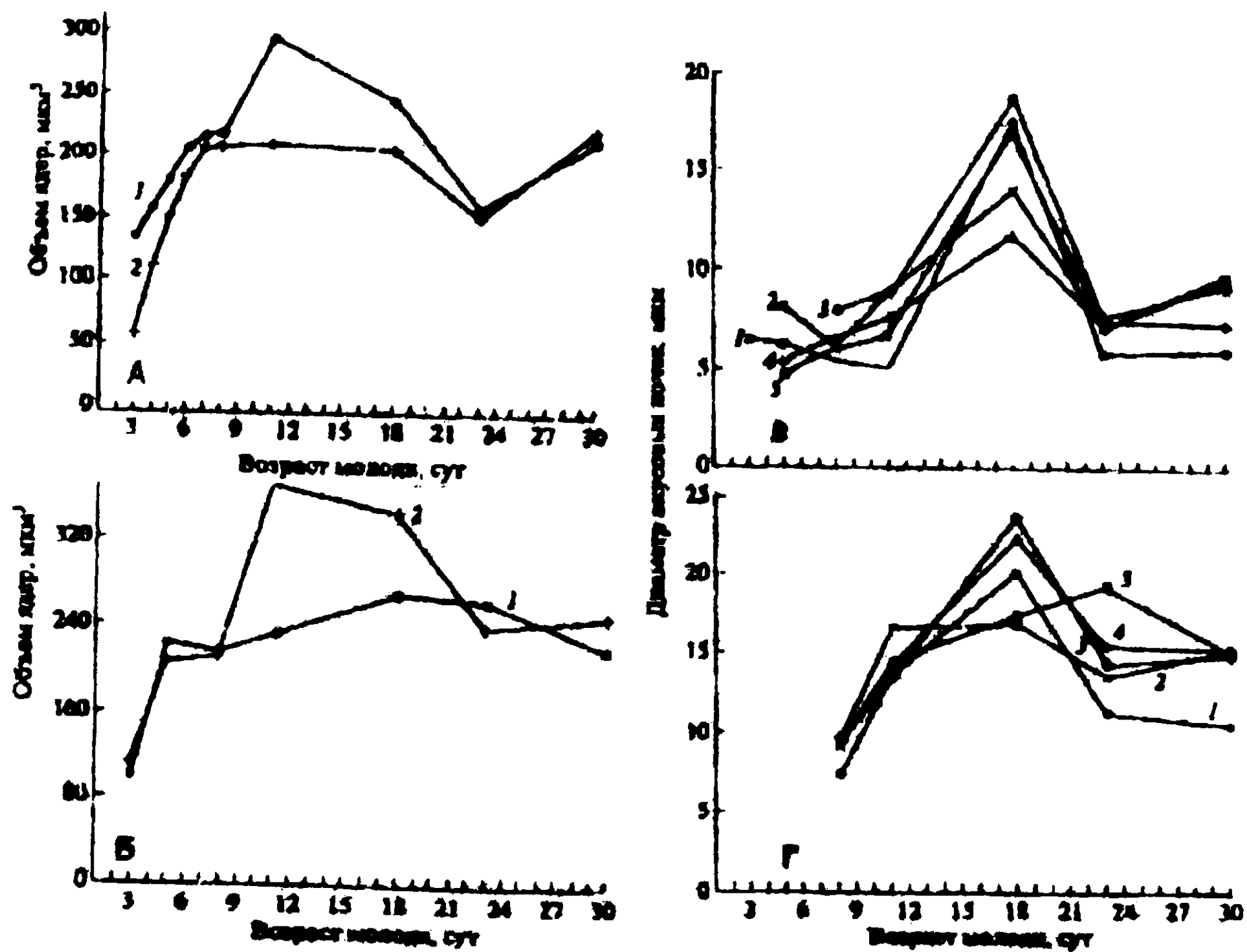


Рис.2 Динамика изменения объема клеточных ядер сенсорных нейронов вкусовых центров шипа (А), русского осетра (Б) и диаметра вкусовых почек шипа (В) и русского осетра (Г) в процессе развития, начиная с момента вылупления. Обозначения: на А-Б. 1 - фациальная доля, 2 - вагусная доля; В - Г: 1 - усик, 2 - губа, 3 - небо, 4 - язык, 5 - жаберные дуги.

нейронов достигнут мест будущей локализации вкусовых рецепторов. У только что вылупившихся предличинки осетровых рыб отсутствует ротовая щель и нет никаких признаков развития вкусовых рецепторов. Через 1-2 суток после вылупления происходит прорыв ротовой щели, губных складок пока нет, но появляются шаровидные зачатки пары латеральных усиков. С началом перехода предличинки на смешанное питание, т.е. в возрасте 5-6 суток у них уже есть две пары коротких усиков, на которых у представителей сем. *Acipenseridae* появляются первые вершины вкусовых рецепторных клеток (рис. 3А, Б). Ультраструктурная организация этих клеток описана Р. А. Певзнер (1981). При этом, поверхность усика стала бугристой; светлые вершины вкусовых клеток образуют скопления на эпидермальных буграх в окруже-

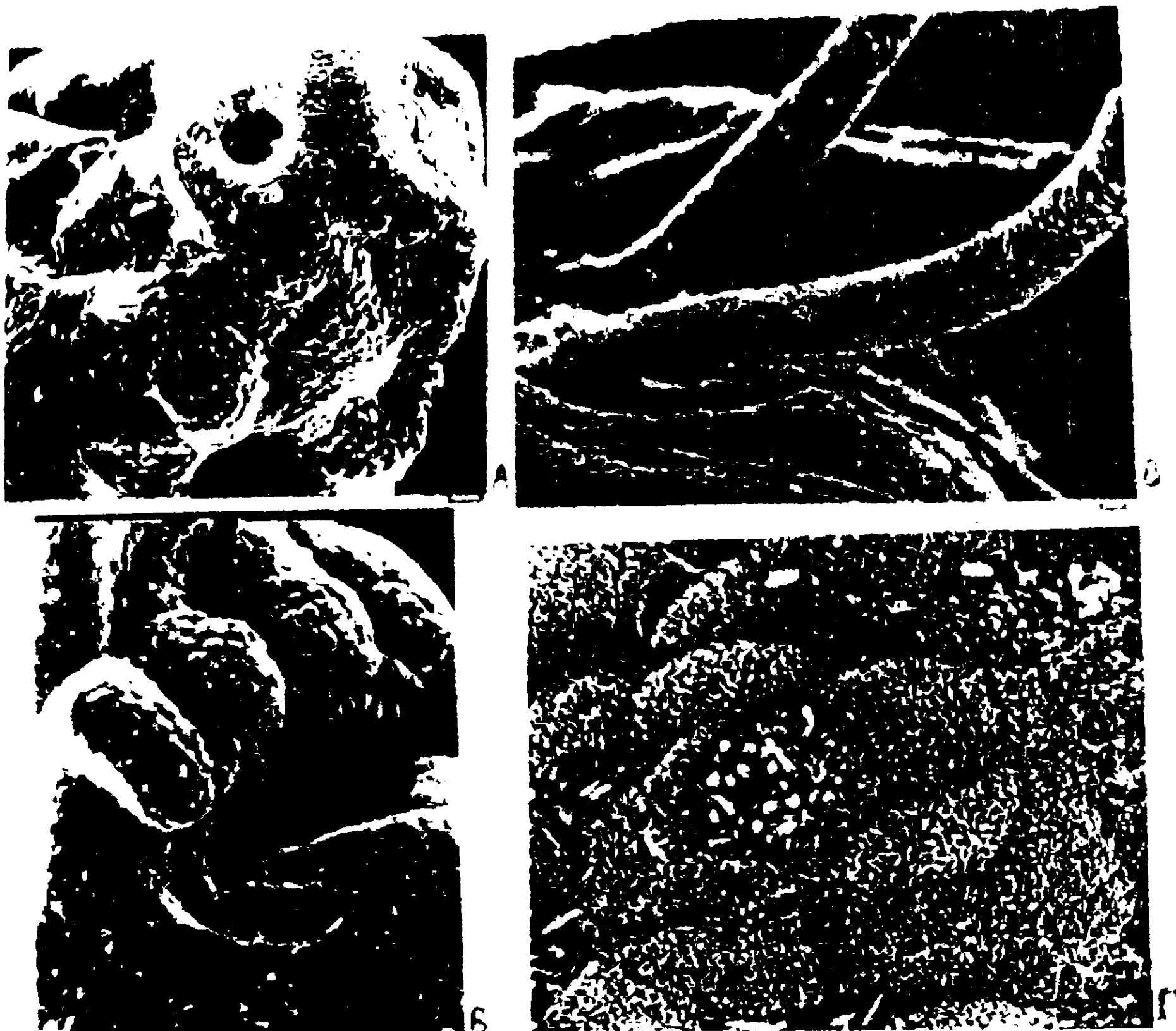


Рис 3 Развитие вкусовой сенсорной зоны на усиках у личинки севрюги. А - голова личинки в возрасте 1 суток после вылупления. Б - рот и усики личинки в возрасте 4 суток после вылупления. В - усики малька. Г - вкусовая почка в эпидермисе усика. Объяснения в тексте. Калибровка 10 мкм.

нии микровиллярных клеток. Оформленных вкусовых почек пока нет. Спустя 1-1,5 суток поверхность обеих пар усиков, верхней губы и расширений губных складок изобилуют молодыми вкусовыми почками. В слизистой выстилке ротовой полости осетров первые скопления вкусовых рецепторных клеток появляются позже чем на усиках с запозданием примерно на сутки и располагаются в непосредственной близости к акродонным зубам. В дальнейшем здесь формируются высокие вкусовые сосочки с вкусовой почкой на вершине (рис. 4). Таким образом, наружные и внутриротовые вкусовые рецепторы развиваются

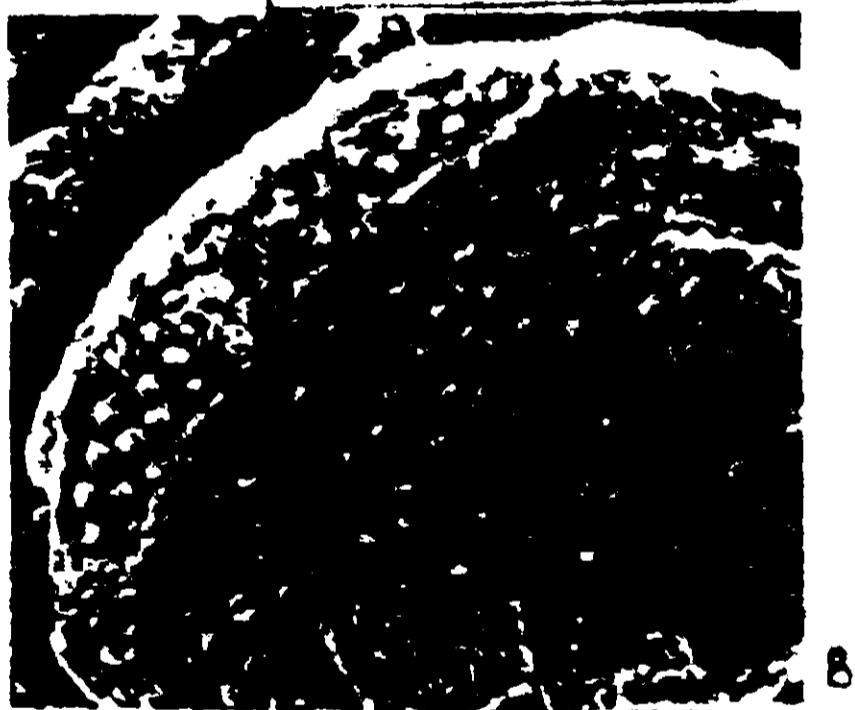
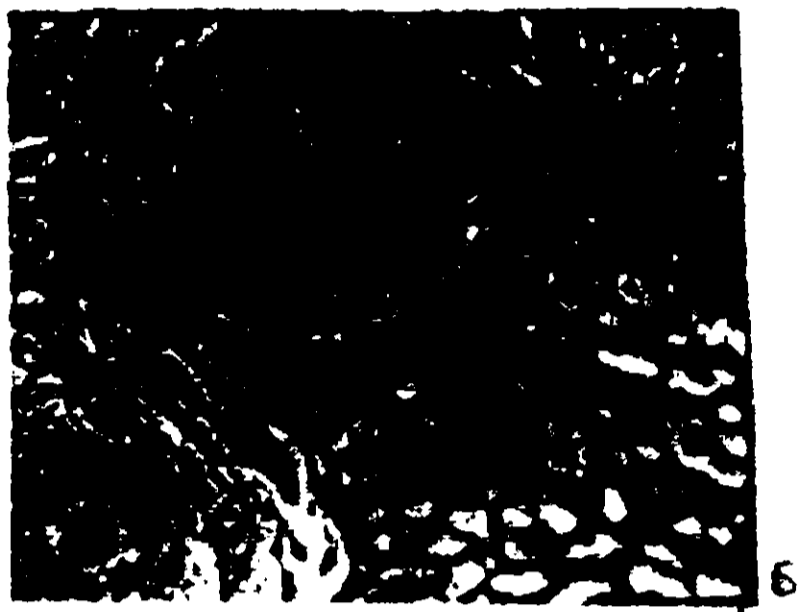
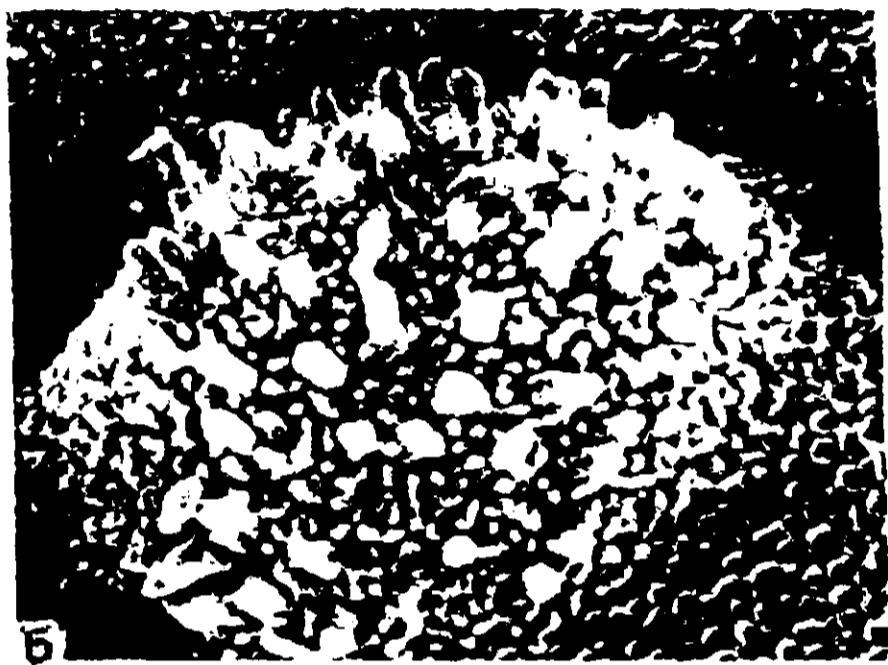
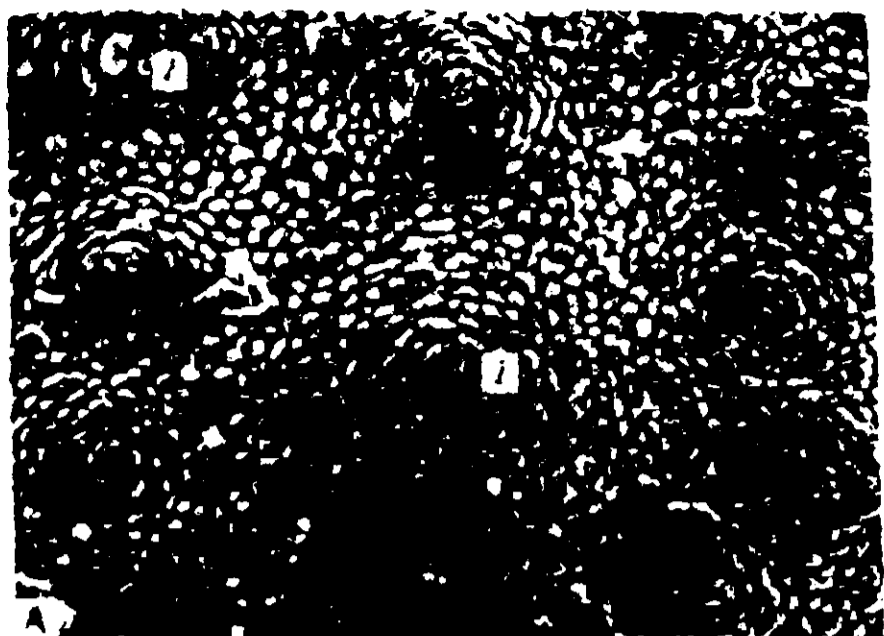


Рис.4. Вкусовая зона на небе куринского осетра. А - вкусовые сосочки конического типа с вкусовыми почками на вершине (1). Б - одна вкусовая почка. Калибровка 10 мкм.

Рис.5 Вкусовая зона на языке. А - язык веслоноса, усеянный вкусовыми сосочками. Б - вкусовые сосочки языка веслоноса. В - язык севрюги с редкими мелкими вкусовыми сосочками в центре. Калибровка 40 мкм.

гетерохронно, причем первыми у осетров появляются наружные вкусовые рецепторы на усиках - довольно далеко от ротовой полости.

В отличие от представителей рода *Acipenser*, являющихся типичными бентофагами, у личинок пелагических видов - веслоноса (род *Polyodon*) и белуги (род *Huso*), первые вкусовые почки появляются связи с переходом на смешанное питание, в ротовой полости, где они возвышаются на конических эпидермальных вкусовых сосочках.

тишь через 1-2 суток можно обнаружить вкусовые почки в базальной части усиков, т.е. приближенно к ротовой полости. У этих пелагических видов гетерохрония в появлении вкусовых рецепторов имеет обратную направленность по сравнению с осетрами.

В процессе развития у всех исследованных видов локализация наружных и интраоральных вкусовых рецепторов приобретает выраженный зональный характер, когда каждая вкусовая зона окружена эпидермисом, не имеющим вкусовых рецепторов. Экстраоральные вкусовые рецепторы формируют сенсорные зоны на усиках (рис. 3В, Г), на верхней губе, на губных складках в углах рта. В ротовой полости выделяются зоны неба, языка, жаберных дуг. Распределение вкусовых зон, их размеры и особенности морфологии обладают некоторой видоспецифичностью. Так, наружные вкусовые рецепторы у бентофагов концентрируются на дистальной части усиков, а у пелагических видов - в базальной части усиков. При этом, вкусовые почки на усиках у первых значительно более многочисленны, чем у вторых. Однако, пелагические виды отличаются более обильными и морфологически разнообразными интраоральными вкусовыми рецепторами (рис. 5). Из работ по физиологии этих рецепторов (Finger, Monta, 1985; Kiyohara, et al, 1985) на других видах рыб следует, что разные вкусовые зоны получают различную иннервацию, а согласно данным по поведению (Касумян, 1997), вкусовые сенсорные зоны осетров различаются функционально. Наши наблюдения показывают, что в раннем онтогенезе у осетровых рыб различные вкусовые зоны дифференцируются гетерохронно. Явление гетерохронии при дифференцировке сенсорных зон очевидно свойственно вообще вкусовой системе позвоночных. Так, у млекопитающих сенсорные зоны языка, получающие разную иннервацию, дифференцируются в раннем онтогенезе гетерохронно (Ибадов, 1973, Тарасова, 1975).

В экспериментах на молоди русского осетра мы изучали влияние обеспеченности пищей на состояние вкусовых рецепторов разных зон (Девицина, Гаджиева, 1994). Оказалось, что у личинок и мальков осетра, не получающих пищу в течение 5 или 10 суток, вкусовые почки разных сенсорных зон проявляют различные реакции. Наиболее сильным морфологическим изменениям дистрофического характера подвергались вкусовые рецепторы, иннервируемые IX и X нервами - это глоточная зона, жабры. При этом, вкусовые почки зон иннервации VII нерва (небо, губы, усики) не подвергались дистрофии, а уменьши-

лись в размерах и увеличивали свою численность. Это указывает на высокую морфологическую лабильность вкусовой рецепции что имеет большое адаптивное значение и особенно для ранней молодежи, у которой вкус играет ведущую роль в пищевом поведении

Морфологическая лабильность вкусовой рецепции проявилась и в опытах с хроническим аносмированием мальков осетра и севрюги (Касумян, Девицина, 1997). Через 6 месяцев после аносмирования рыбы в значительной мере восстанавливали утраченную чувствительность к химическим стимулам, при этом у них отмечалось морфологическое видоизменение усиков, на которых выросли крупные вкусовые сопочки или бугры, несущие крупные вкусовые почки. Увеличивалось достоверно и среднее количество вкусовых почек в наружных вкусовых зонах, но не было этого эффекта в интраоральных зонах.

Мы проследили динамику изменения размеров вкусовых почек от момента их появления у предличинки до первых этапов малькового периода у трех видов - куринского осетра, шипа и белуги (Девицина, Гаджиева, 1996). Результаты показали, что у всех видов в возрасте от 9 до 15 суток (это конец периода смешанного питания и переход на полное экзогенное питание) происходит резкое возрастание их размеров в 3-4 раза во всех сенсорных зонах с максимумом на 15-16 суток и последующее снижение их размеров к возрасту 23 суток почти до исходного уровня, который был в конце периода смешанного питания (рис. 2В, Г). Эти изменения четко коррелируют по срокам с соответствующими морфо-функциональными изменениями нейронов во вкусовых центрах. По-видимому, начиная с возраста 9-18 суток мы имеем дело с морфологическим проявлением резкой и обратимой функциональной активации всей вкусовой системы у осетровых рыб в связи с переходом на полное экзогенное питание.

Известно, что у рыб с хорошо развитой вкусовой системой (карповые, сомовые) вкусовые рецепторы различной локализации имеют топографические проекции в соответствующих первичных мозговых центрах (Kiyohara et.al., 1985, Marui, 1986; Kanwal, Carpio, 1983). Возможно, что у осетровых рыб, обладающих мощной вкусовой системой с крупными вкусовыми центрами, также есть топографическое представление вкусовых зон в соответствующих центральных образованиях, но этот вопрос требует дальнейших исследований.

Мы полагаем, что у молодежи осетровых рыб можно выделить две хорошо развитые вкусовые системы - интраоральную и экстра-

оральную, которые в процессе онтогенеза дифференцируются гетерохронно, имеют различную иннервацию, крупные анатомически дифференцированные отдельные мозговые центры в виде лицевой и вагусной доли, различные спектры воспринимаемых стимулов, разную чувствительность и различную функциональную значимость в пищевом поведении, как установлено опытами по поведению (Касумян, 1997). Эксперименты с голодающими рыбами и с хронически аносмизированными особями продемонстрировали наиболее высокую морфофункциональную лабильность экстраоральной вкусовой рецепции и ее большие адаптивные возможности. В критические периоды развития - такие как переход на активное питание - происходит обратимая синхронная, четко выраженная активация обеих вкусовых систем, включая их центральные и рецепторные отделы. Это свидетельствует о тесном взаимодействии двух систем и о большой функциональной значимости именно вкусовой афферентации в данный период развития рыб.

ЛИТЕРАТУРА

- Анохин П.К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. Л.: Медицина. 1968. 227 с.
- Богданов О.Б. Функциональный эмбриогенез мозга. Л. Медицина, 1978. 180 с.
- Девякина Г.В., Гаджиева А.Р. Морфологические особенности развития вкусовых рецепторов в раннем онтогенезе русского осетра, *Acipenser gueldenstaedti* Brandt // Сенсорные системы. 1994. 8, 11-19.
- Девякина Г.В., Гаджиева А.Р. Динамика морфологического развития вкусовой системы в раннем онтогенезе двух представителей осетровых *Acipenser nudiiventris* и *A. persicus*. // Вопр. ихтиологии. 1996. 36, 684-686.
- Девякина Г.В., Кажлаев А.А. Развитие хемосенсорных органов у сибирского осетра и севрюги. // Вопр. ихтиологии. 1992. 32, 167-176.
- Ибадов Н.А. Вкусовой анализатор в онтогенезе человека. // Вопросы морфологии нервной системы. М. Медицина. 1973. 61-67.
- Касумян А.О. Вкусовая рецепция и пищевое поведение рыб. // Вопр. ихтиологии. 1997. 37, 78-93.
- Касумян А.О., Сидоров С.С., Пащенко Н.И., Немчинов А.В. Формирование вкусовой чувствительности в онтогенезе осетровых рыб // Докл. АН. 1992. 332, 193-195.
- Касумян А.О., Девякина Г.В. Влияние ольфакторной депривации на хемосенсорную чувствительность и состояние вкусовых рецепторов осетровых рыб // Вопр. ихтиологии. 1997. 37, 823-835.

- Павлов Д.С., Сбыкин Ю.Н., Попова И.К. Роль органов чувств при питании молоди осетровых рыб. // Зоол журн. 1970 49, 7872-880
- Презнер Р.А. Ультраструктурная организация вкусовых рецепторов костно-хрящевых рыб. II. Личинки, переходящие на активное питание. // Цитология. 1981. 23, 867-873
- Тарасова О.С. Микроэлектрофизиологическая характеристика созревания нейронов ядра лицевого нерва в постнатальном онтогенезе кошки // Аfferентная функция полости рта и проблема переработки информации. Ред. В.Н.Шелихов. М.: Мин здрав. РСФСР. 1975, 90-97.
- Finger T.E. The gustatory system in teleost fish.// Fish Neurobiology. 1. G.Northcutt, R.E.David (ed.). Univ. Michigan Press 1983.
- Finger T.E., Morita Y. Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brain stem connections. // Science. 1985 227, 776-778.
- Kanwal, Caprio An electrophysiological investigation of the oropharyngeal (IX-X) taste system in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* // J Comp. Physiol. 1983. 150, 345-357.
- Kiyohara S, Shiratani T, Ymashita S. Peripheral and central distribution of major branches of the facial taste nerve in the carp.// Brain Res. 1985. 325, 57-69.
- Marui T. Gustation in Fish.//Ann.Kagoshima Dept. 1986 6, 10-27.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ РОСТА КОСТНОЙ (ЭЛАСМОИДНОЙ) ЧЕШУИ У ТИЛЯПИЙ

Биологический факультет МГУ, Москва

Одной из характерных особенностей рыб является способность к формированию мощного наружного панциря в виде разнообразных костных чешуй, эффективно обеспечивающих защитную функцию в водной среде. С середины прошлого века (Mandl, 1839; Agassiz, 1833-1844) принято выделять три основные морфологические типа чешуй, которые в современной литературе называются плакоидная, ганоидная и эласмоидная. Морфологические особенности организации этих разновидностей чешуй подробно охарактеризованы в многочисленных исследованиях разных лет, однако до сих пор обсуждается вопрос о их происхождении и филогенетических взаимоотношениях.

Использование периодичности роста чешуи для определения возраста рыб является традиционным методом в ихтиологии, без которого невозможно ни одно исследование биологии данных животных. Однако, используется для этих целей только чешуя эласмоидного типа. Определение периодичности роста ганоидной и плакоидной чешуи практически не возможно. В связи с этим до сих пор актуальной, как в теоретическом, так и в практическом отношении остается проблема особенностей закладки и роста костных чешуй разных типов. Кроме этого, костная чешуя, формирующаяся в соединительной ткани дермы, является уникальной моделью для исследования фундаментальных проблем остеогенеза. Получение объективных представлений о закономерностях формирования и роста чешуи находится в прямой зависимости от расшифровки свойств ее отдельных клеток.

Целью настоящей работы явилось морфологическое изучение тканевой организации костной чешуи, а также автордиографическое исследование свойств клеток, участвующих в ее формировании. Для этого с помощью классических гистологических методов на декальцинированном материале была исследована тканевая организация эласмоидной чешуи на примере тилляпий и автордиографически изучена

роль клеток дермы в формировании и росте костных пластинок чешуи, в частности способность клеток к пролиферации (H^3 -тимидиновая маркировка) и к синтезу межклеточного вещества (маркировка H^3 -пролином). На основании полученного экспериментального материала была создана пространственная модель строения и роста эласмоидной чешуи.

Материалы и методы

В работе были использованы сеголетки тилляпий (*Sarotherodon mossambicus*). Лоскуты кожи с боков тела тилляпий фиксировали в ФСУ в течение двух часов, с последующей декальцинацией в трилоне (ЭДТА) 1-2 суток. Кожные лоскуты после декальцинации заливали в парафин и получали серийные срезы, толщиной 5-7 мкм. Срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином, Азаном по Гейденгайну, Маллори или альциановым синим, что определялось конкретными задачами исследования. Для автордиографического анализа чешуи сеголеток тилляпий радиоактивные предшественники инъецировали внутримышечно H^3 -тимидин (уд. акт. 1,8 мкюри/мг) вводили из расчета 10 мк Кюри на 1 г веса тела и H^3 -пролин (уд. акт. 72 мкюри/мг) 20 мк Кюри на 1 г веса. Меченые предшественники вводили в разные сроки до фиксации лоскутов кожи. Срезы после депарафинирования обрабатывали 5% раствором ТХУ в течение 1 часа при $4C^0$ и заливали в фотозмульсию типа "М" (НИИХИМФОТОПРОЕКТ). Экспозиция при $4C^0$ продолжалась 20-30 дней. После фотообработки (Хрущов, 1969) срезы окрашивали гематоксилин-эозином и проводили подсчет индекса мечения на 200-1000 клеток в зависимости от величины индекса.

Результаты и обсуждение

Подробности гистологического строения эласмоидной чешуи (циклоидной и ктеноидной) были детально исследованы в начале века (Times, 1906; Hase, 1907, 1911), на светооптическом уровне, позже (70-80-ые годы) появились электронномикроскопические работы, в которых подвергались анализу чешуи многих костистых рыб (Lanzing,



Рис. 1. Область чешуйного мешка. Пластинки чешуи, окруженные остеобластами. Объектив 100, окуляр 25

Wright, 1976, Schonbomer et al. 1979, 1971). Однако эти исследования единичны, носят описательный характер и не позволяют решить вопрос о закономерностях роста эласмоидной чешуи.

Гистологический анализ срезов декальцинированной кожи тигляши позволил нам выявить следующие морфологические особенности строения костных чешуй. Каждая костная чешуя имеет отчетливо слоистое строение и состоит из параллельно уложенных пластинок, отделенных друг от друга цементирующим веществом и завершающихся уплотненным образованием, называемым склеритом (рис. 1) (Лапин, 1971, Бурдак, 1973). Жизнеспособные клетки обнаружены нами только около нижней костной пластинки, прилежащей к соединительной ткани, образующей своеобразный мешок вокруг концевой части чешуи (рис. 2). Этим клеткам, названным в конце прошлого века склеробластами (Klaatsch, 1894) и получившим в современной литературе название остеобластов и фибробластов (Meunier, 1984), отводится ведущая роль в осуществлении процессов формирования костных пла-



Рис. 2. Формирующийся склерит. Объектив 100, окуляр 25.

стинок чешуи. Однако прямые доказательства этого отсутствуют.

В составе наиболее глубокой костной пластинки на тонких тотальных препаратах изолированной чешуи нами были выявлены крупные отростчатые клетки, которые по морфологическим признакам могут быть отнесены к категории остецитов (рис. 3). Для объективной оценки участия клеток в формировании межклеточных структур нами был проведен анализ их способности к включению Н³-пролина. Меченый пролин используется в исследованиях процесса коллагенообразования, так как является наиболее специфическим предшественником коллагена (Хрущов, 1969).

В настоящей работе мечение Н³-пролином было использовано для решения двух задач. Первая - оценить участвуют ли клетки, окружающие молодую костную пластинку, в синтезе межклеточных структур с последующим их перемещением в межклеточный матрикс. Вторая - использовать Н³-пролин в качестве стабильного маркера, позволяющего определять время формирования и возраст костной пластинки.



Рис. 3. Остеобласты, прилежащие к чешуйной пластинке. Объектив 100, окуляр 25.

При импульсном введении Н³-пролина (3 часа) активное включение было обнаружено в клетках, непосредственно прилежащих к клеточному матриксу нижней пластинки (20% меченых остеобластов). Клетки (остеоциты), находящиеся в толще нижней костной пластинки, Н³-пролин не включают. Через одни сутки и трое суток после введения изотопа метка обнаруживается над межклеточным веществом, что экспериментально доказывает участие клеток в синтезе белков межклеточного вещества костной пластинки. Ведущая роль в этом процессе принадлежит остеобластам.

Клетки, активно включающие Н³-пролин, при импульсном введении обнаружены нами исключительно на нижней стороне образующейся костной пластинки. Верхние клетки, которые морфологически соответствуют остеобластам, Н³-пролин не включают. Эти наблюдения согласуются с электронномикроскопическими данными Лансига и Райта (Lanzig, Wright, 1976), которые отмечают, что синтезируют коллаген только клетки, локализованные на нижней стороне образующейся костной пластинки. Верхние, покрывающие клетки обеспечивают

процесс кальцинации. Расположение клеток и жестко закрепленное направление кальцинации определяет, по нашему мнению, формирование склеритов чешуи.

Анализ автографов, полученных в отдаленные сроки после введения H^3 -пролина, позволил проследить судьбу меченого костного матрикса. Так через семь дней после введения изотопа межклеточное вещество новообразующейся костной пластинки оказывается интенсивно меченым; в составе матрикса встречаются отдельные меченые остециты. Через 14 и 21 день после введения изотопа метка над матриксом сохраняется, а меченые клетки исчезают, что связано с их гибелью. В это время происходит формирование новой костной пластинки, матрикс которой метку не содержит, так как формируется в отсутствие свободного H^3 -пролина. При этом меченая костная пластинка отодвигается от дермы и может служить маркером, позволяющим оценить время новообразования следующей костной пластинки. Наши автораддиографические данные свидетельствуют что ее формирование завершается в течение недели. Таким образом, H^3 -пролин может быть рекомендован в качестве маркера для анализа скорости формирования костной пластинки.

В настоящее время одним из наиболее спорных и невыясненных вопросов является проблема источников остеобластов, участвующих в образовании костных пластинок. Выявление локализации делящихся остеогенных элементов необходимо для понимания закономерностей роста костной чешуи на протяжении онтогенеза. В связи с этим, одной из задач настоящего исследования явился анализ локализации остеогенных клеток, способных к пролиферации (включению H^3 -тимидина). Для оценки пролиферативной активности клеток, участвующих в формировании костной пластинки чешуи, был проведен автораддиографический анализ включения специфического предшественника ДНК - H^3 -тимидина. Изотоп вводился импульсно, за три часа до фиксации кожи. При анализе автографов было обнаружено, что клетки (остеобласты), прилежащие к матриксу костной пластинки, H^3 -тимидина не включают, следовательно, находятся вне митотического цикла. Индекс мечения фибробластических элементов окружающей соединительной ткани не превышает 2%. Столь незначительный уровень пролиферации клеток в зоне формирования костной пластинки предпола-

гаст существование за пределами местной соединительной ткани клеток-предшественников с более высокой способностью к делению

Для решения вопроса о наличии активно пролиферирующего резерва клеток, участвующих в формировании (росте) чешуи, фиксация участков кожи тилапий производилась через 1, 3 суток, а также 1, 2 и 3 недели после введения H^3 -тимидина. Данные подсчета индекса мечения фибробластоподобных клеток соединительной ткани представлены на рис. 4, 5. Анализ изменений числа меченых клеток на протяжении эксперимента показал, что индекс H^3 -тимидиновой метки фибробластоподобных клеток соединительной ткани резко возрастает через сутки после введения H^3 -тимидина. К 3-м суткам эксперимента мечеными оказываются многие остеобласты, прилежащие к межклеточному матриксу костной пластинки (рис. 6), индекс мечения составляет 27%. Мечеными оказывается и часть клеток, заключенных внутри костной пластики (остеоциты). Постепенно к 21 суткам индекс мечения значительно снижается и достигает исходного уровня (5%). Эти данные свидетельствуют, что для остеогенных элементов, формирующих чешую, существуют активно пролиферирующие клетки-предшественники, которые с током крови мигрируют в ткань, где снижают уровень пролиферации и заканчивают процессы дифференцировки, превращаясь в остеобласты. Клетки, обладающие столь высокими пролиферативными потенциями, относящиеся к системе тканей внутренней среды, локализованы только в гемопоэтической ткани рыб (почки) (Золотова, 1989). Миграция гемальных предшественников фибробластических элементов в кожу при заживлении экспериментальных ран у рыб показана ранее (Золотова, 1989). Таким образом, в настоящей работе впервые автораддиографически показано, что активная пролиферация (включение H^3 -тимидина) клеток-предшественников остеогенных элементов происходит за пределами дермы, видимо, в гемопоэтических органах. С током крови меченые клетки мигрируют в соединительную ткань, подстилающую чешую, сохраняя ограниченные потенции к делению. Окончательная дифференцировка осуществляется в соединительной ткани, что сопровождается началом активного белкового синтеза (включение H^3 -пролина). Продукт синтеза (коллаген) постепенно выводится из клетки и включается в состав формирующейся костной пластинки. Через неделю после начала эксперимента регист-

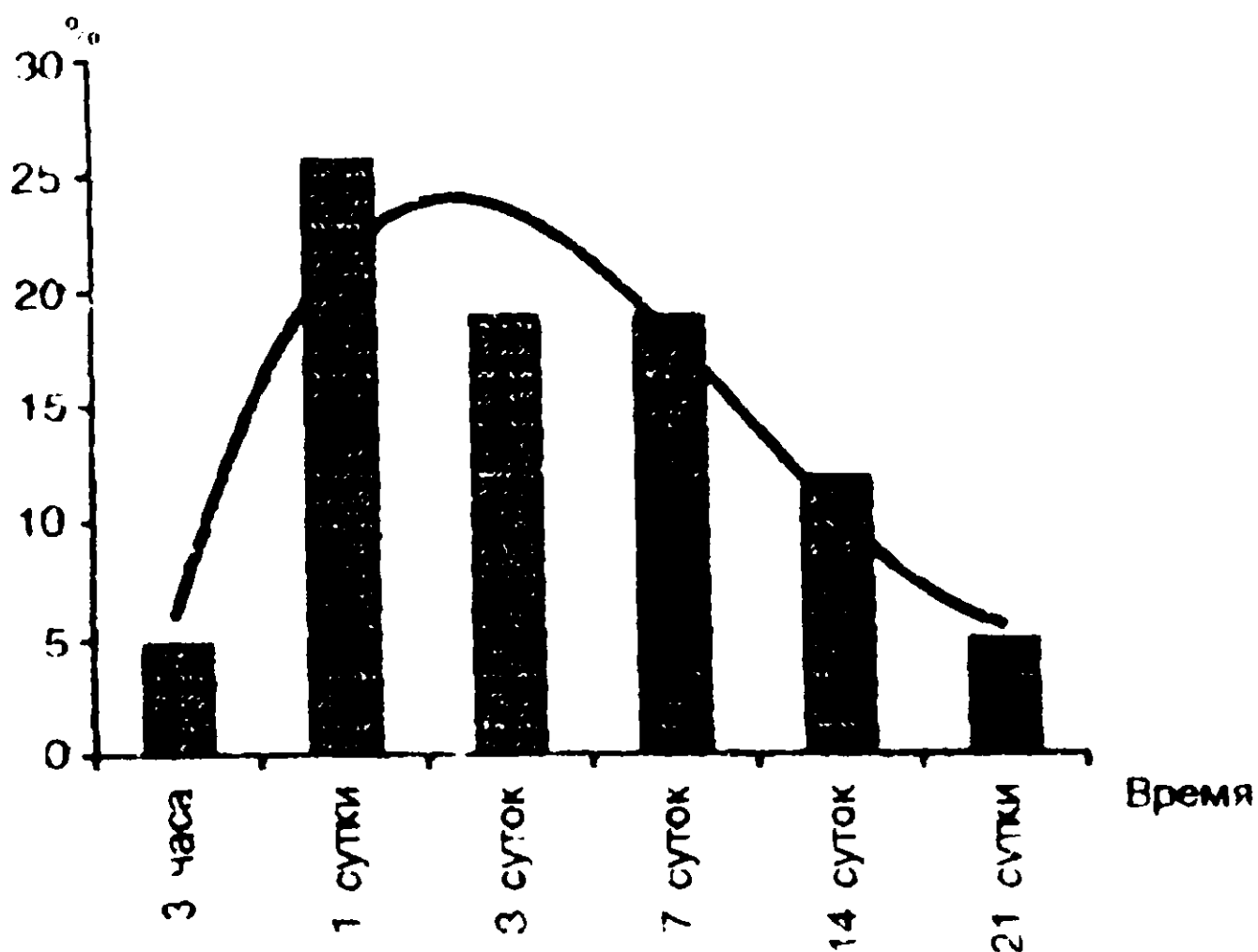


Рис. 4 Индекс меченя остеобластов в разные сроки после введения H^3 -тимидина (сеголетки)

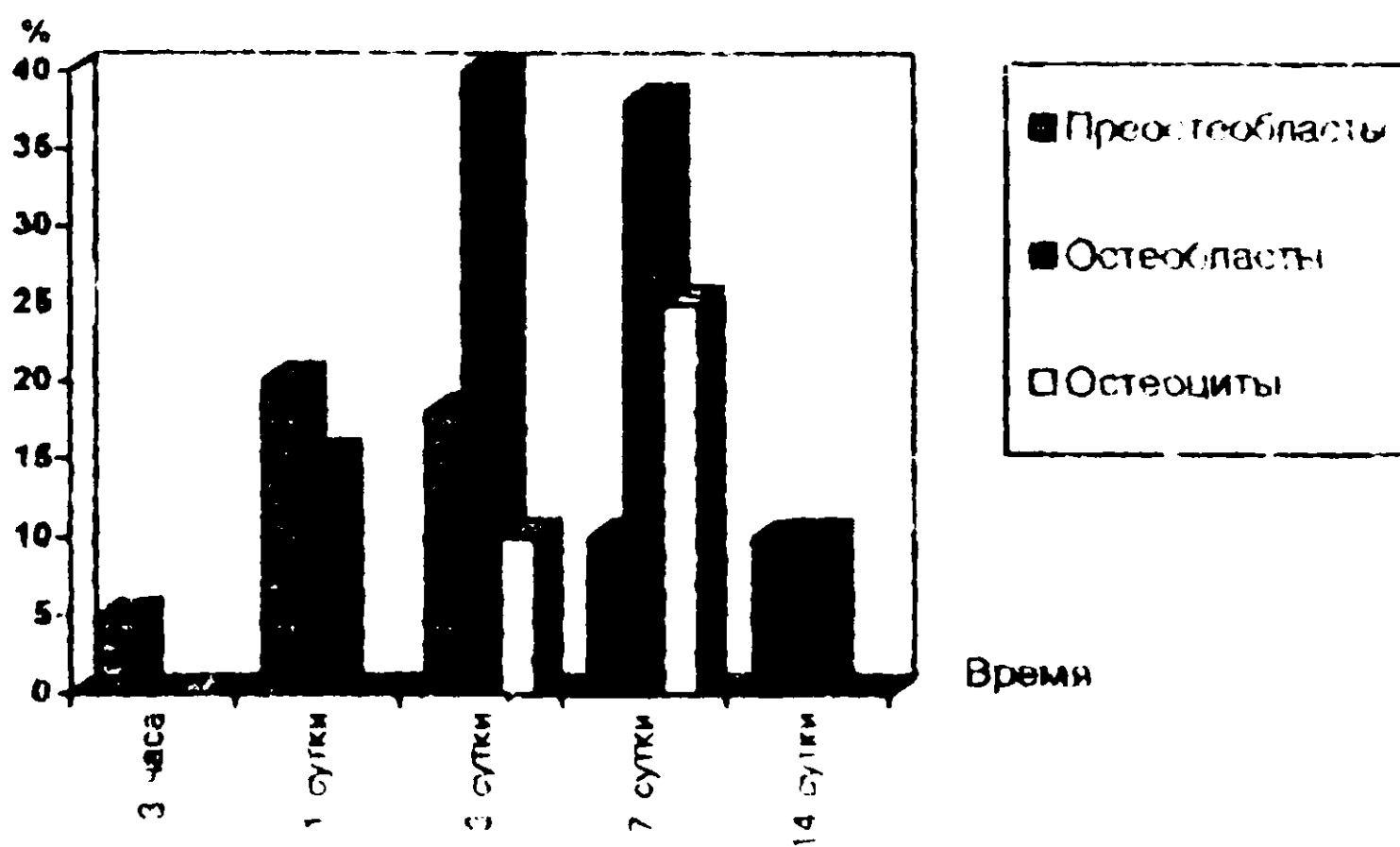


Рис. 5 Индекс меченя клеток остеогенного ряда в разные сроки после однократного введения H^3 -тимидина (сеголетки)

рируются отдельные меченые остеоциты, находящиеся в составе вновь сформированной костной пластинки, а остов костной пластинки ока-

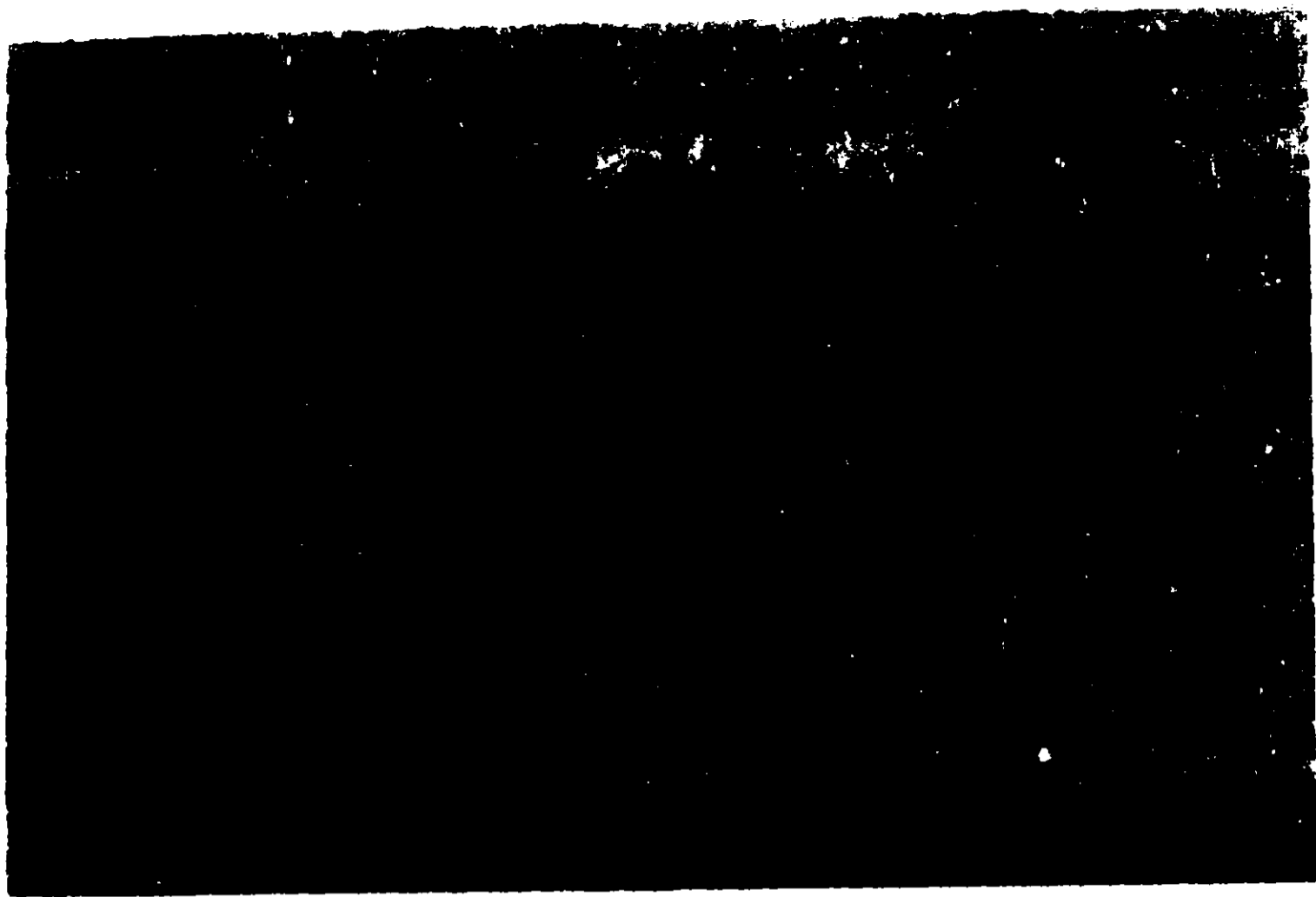


Рис. 6. Меченые H^3 -тимидином клетки в области чешуйного мешка. Меченый предшественник введен за 3 дня до фиксации. Стрелкой отмечен чешуйный мешок. Объектив 40, окуляр 25.

зывается полностью сформированным. Процесс кальцинации начинается несколько позднее и полностью завершается в течение последующей недели, так как именно к этому сроку остеоциты во вновь образованной костной пластинке гибнут, что связано с ухудшением питания из-за кальцинации костного матрикса. Таким образом, в условиях наших экспериментов одна костная пластинка у сеголеток тилляпий формируется в течение недели.

Общие представления о формировании эласмоидной чешуи. Модель ее строения и роста.

На основании сопоставления полученных в настоящей работе данных с наблюдениями авторов, исследовавших тонкое строение костных чешуй, динамику их возникновения в раннем онтогенезе и при экспериментальной регенерации, можно предложить гипотетическую схему пространственной организации чешуи и обсудить возможные механизмы ее роста на протяжении онтогенеза. Костная чешуя состоит из концентрических пластинок, подстилающих друг друга, при этом

диаметр каждой последующей пластинки больше предыдущей. Наружная поверхность каждого кольца завершается полосой склеритов, маркирующих краевую зону и позволяющих визуальнo идентифицировать каждый последующий слой на изолированной чешуе

Клетки, участвующие в формировании пластинок чешуи, локализованы в достаточно ограниченной зоне и выстилают краевую и нижнюю поверхность наиболее молодой, формирующейся в данный момент времени пластинки. Этот наиболее активный фрагмент чешуи находится в сетчатой зоне соединительной ткани дермы. Клетки, обладающие остеогенными потенциями, морфологически и функционально неоднородны. Часть из них способна к ограниченному делению, другая ведет активный синтез межучочных структур (коллагена и мукополисахаридного матрикса), третья преимущественно осуществляет процесс кальцинации (Maskaw, Yamada, 1970. Zanzing, Wright, 1976; Schonborner et al, 1973). Территория, где сосредоточены все три клеточные категории, достаточно локальна и может быть названа маргинальной зоной формирующейся пластинки. Маргинальная зона - место наибольшей активности клеток, согласованная работа которых обеспечивает эффективный рост и кальцинацию чешуйной пластинки.

Основываясь на свойствах клеток маргинальной зоны, можно с цитологических позиций объяснить причины периодического роста чешуи на протяжении онтогенеза. Первая костная пластинка (верхняя) чешуи, имеющая правильно округлую форму, образуется очень быстро (1-2 дня) как в онтогенезе, так и при регенерации чешуи (Sire, 1983, 1986). Отмечено, что поверхностный слой быстро кальцинируется (Olson, Watabe, 1980). Фронт кальцинации связан с клетками, лежащими на внешней поверхности растущего матрикса и остеобластами, расположенными в краевой зоне костной пластинки. Нижние, обращенные к соединительной ткани слои, остаются не кальцинированными до трех недель. Такое расположение клеток поляризует процессы синтеза коллагена и его кальцинации и делает возможным формирование новых волокнистых слоев только снизу за счет подслоения новых генераций остеобластов. Кальцинация верхнего и краевого слоев приостанавливает возможность как миграции клеток, так и белкового синтеза, что ограничивает рост костной пластинки, как сверху, так и с краев. Иными словами, кальцинация является своеобразным механиз-

мом ограничения роста костной пластинки на периферии. При этом часть остеобластов замуровывает себя в костный матрикс, становится остеocyтами и вскоре погибает. В результате описанного процесса формируется первая округлая костная пластинка - своеобразная кальцинированная крышка, находящаяся на поверхности будущей многослойной чешуи. Следующая пластинка образуется за счет подстилающих ее остеобластов, формирующих фибриллярные структуры центральной части пластинки. Эти клетки синтезируют коллаген во всех направлениях, увеличивая толщину пластинки снизу. Остеобласты же, локализованные на внешнем крае, синтезируют коллаген однонаправленно к центру пластинки, что приводит к появлению своеобразного валика, который вскоре кальцинируется благодаря тем же клеткам. Результатом деятельности краевых остеобластов является появление склеритов (Zilberberg et al, 1988; Dane, Tucker, 1986, Byers et al, 1980, Lanzing, Wright, 1976; Schonborner et al, 1979).

Постепенное подслаивание остеобластов, синтез матрикса только нижними клетками прямо доказано нами в автордиографических экспериментах по включению H^3 -тимидина и H^3 -пролина. Эти процессы продолжаются на протяжении всего онтогенеза, что и определяет непрерывный рост эластоидной чешуи. Сначала кальцинация охватывает только периферию концентрической волокнистой пластинки, где возникает первичный фронт кальцинации. Впоследствии кальцинация распространяется вдоль всей фиброзной пластинки и захватывает ее целиком. В результате этих процессов возникает слоистая чешуя, верхняя часть которой представлена кальцинированной тканью, а нижняя более молодая, имеет волокнистую основу. Степень кальцинации матрикса увеличивается в направлении верхних слоев (рис. 7).

Таким образом, зоны прироста чешуи, так называемые циркули, отделенные друг от друга рядами склеритов, являются результатом жизнедеятельности клеток остеогенного ряда, локализованных в маргинальной зоне чешуи. Пролиферирующие клетки-предшественники остеогенных элементов мигрируют в соединительную ткань дермы с током крови и формируют клеточный резерв, готовый при необходимости осуществлять процессы физиологической и репаративной регенерации чешуи. Эта популяция остеогенных предшественников по характеру обновления аналогична быстро обновляющимся популяциям

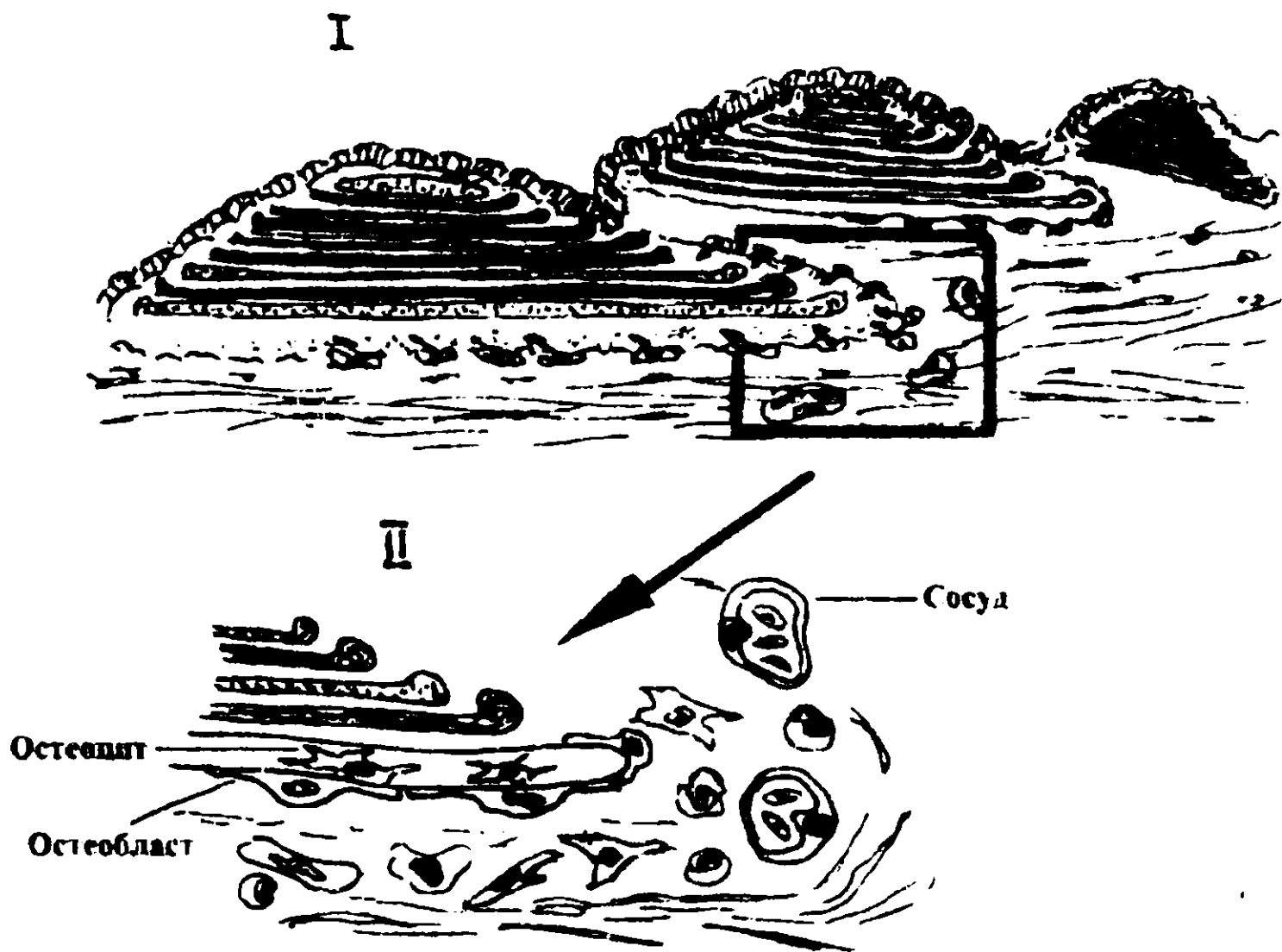


Рис. 7. Схема строения пластинчатой (эласмоидной) чешуи. I - общий вид; II - чешуйный мешок с клетками остеогенного ряда.

макрофагов и фибробластов, участвующих в осуществлении воспалительной реакции и рубцевании кожных ран у рыб (Золотова, 1989). Видимо, для остеогенных элементов чешуи, макрофагов и фибробластов соединительной ткани рыб существует единая камбиальная система, территориально объединенная с кроветворной тканью. Это предположение находит генетическое подтверждение, которое основано на хорошо изученной мутации карпа. Известно, что существуют две пары аутосомных, не сцепленных друг с другом генов, определяющих характер чешуйного покрова (SSNN, ssnn) у карпов. Гомозиготные особи, несущие рецессивный ген бесчешуйности, нежизнеспособны и погибают на стадии вылупления, гетерозиготы по гену N жизнеспособны, но в большом проценте случаев имеют нарушения покрова, осевого скелета и системы кроветворения (анемии и иммунодефициты) (Кирпичников, 1987). Эти данные свидетельствуют о единстве источников и существовании общего клеточного предшественника для элементов кроветворной природы и остеогенных клеток чешуи, скелета, а также фибробластов соединительной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

- Буроак В.Д. Функциональная морфология чешуйного покрова рыб. - Киев: Наук. думка. 1979, 3-130.
- Золотова Т.Е. Автореф. дис. канд. биол. наук. МГУ. 1989.
- Кирпичников В.С. Генетика и селекция рыб. Л.: Наука. 1987, 519 с.
- Латин Ю.Е. Закономерности динамики популяций рыб в связи с длительностью их жизненного цикла. М.: Наука. 1971, 175 с.
- Суворов Е.К. Основы ихтиологии. Л.: Сов. наука. 1948.
- Хрущов Н.Г. Функциональная цитохимия рыхлой соединительной ткани. - М.: Наука. 1969, 238 с.
- Byers H.R., Fujiwara K., Porter K.R. Visualization of microtubules of cells in situ by indirect immunofluorescence // Cell Biology. 1980. 77, 6657-6661.
- Dane P.J., Tucker J.B. Supracellular microtubule alignments in cell layers associated with the secretion of certain fish scales // J. Cell Sci. Suppl. 1986. 5, 273-291.
- Hase A. Uber das Schuppenkleid der Teleosteer. // Jen. Zsehr. Naturwiss. 1907. 42, 607-668.
- Hase A. Studien ucher das Intergument *Cyclopterus lumpus* L. - Jen. Zshr. Naturwiss. 1911, 47, 217-342.
- Lanzing J.R., Higginbothmann D.R. Scanning microscopy of surface structures os *Tilapia mossambica* // J. Fish Biology. 1974. 6, 307-310
- Klaatsen A. Uber die Herkuuft der Scleroblasten// Morphol. Jb. 1894. 21. 153-240.
- Meunier F.J. Spatial organisation and mineralisation of the basal plate of elasmoid scales in osteichthyans // Ann. Zool. 1984. 24, 953-394
- Maekawa K., Yamada Y. Some histochemical and fine structural aspects of growing scales of the rainbow trout // 1970 XXI, 2, 70-78.
- Olson O.P., Watable N. Studies on formation and resorption of fish scales. Ultrastructure of developing scales in newly hatched fry of the Sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) // Cell Tissie Res. 1980. 211, 303-316.
- Schouborner A.A., Boivin G., Bond C.A. The mineralization processes in Teleost fish scales. // Cell Tissue Res. 1979. 202, 203-212.
- Sire J.Y. Gerauder J. Fine structure of the developing scales in the cichlid *Hemichromis bimaculatus* // Acta Zool. Stock. 1983. 1, 1-8.
- Sire J.Y. Ontogenic development of surface ornamentation in the scales of *Hemichromis bimaculatus* // J. Fish Biol. 1986. 28, 713-724
- Times H. Developmental structure, morphology of the scales in some Teleostean fish // Quart. J. Micr. Sci. 1906. 49, 39.
- Zylberberg L., Bereliter-Hahn J., Sire J.Y. Cytoskeletal or ganization and collagen orientation in the fish scales // Cell Tissuc Res. 1988. 253, 597-607.

**РАЗМЕРНАЯ СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПИТАНИЯ РЫБ ЭФФЕКТЫ
НЕОДНОРОДНОГО РАЗМЕЩЕНИЯ КОРМА И КОНФЛИКТ
МОТИВАЦИЙ**

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

Размерная селективность (избирательность) питания, которая представляет собой неслучайный выбор пищевых частиц в диапазоне потенциально доступных объектов, интенсивно изучается на рыбах в течение почти полувека. Начало экспериментальному изучению избирательного питания рыб на количественной основе и в строго контролируемых условиях положено работой В.С.Ивлева (1955). Полученные им кривые элективности (зависимость индекса элективности, E , от размера пищевого объекта) имеют куполообразный вид. При этом, у планктофагов мода распределения смещена в область относительно мелких размеров, хищников (ихтиофагов) – в область крупных, а для бентофагов получена симметричная кривая. В дальнейшем эти зависимости находили подтверждение в экспериментах на других видах рыб (Bence, Murdoch, 1986; Confer, O'Brien, 1989 и др.). В то же время отмечались и явные несоответствия. Например, планктоядные личинки плотвы, которые согласно кривым элективности должны потреблять преимущественно мелких жертв, напротив, выбирали частицы близкие по размерам к максимально доступным (Михеев, 1984).

Размерная селективность питания получила заметно большее внимание исследователей по сравнению с другими аспектами избирательного питания в силу следующих причин: 1) с размерами жертв тесно связана их энергетическая ценность; 2) различия в заметности и уязвимости жертв разного размера определяют их доступность и траты энергии на поимку; 3) размеры легко измерить, а их эффекты можно сравнительно просто оценить в эксперименте.

Попытки объяснить селективность как компромисс между энергетической выгодой и затратами привели к созданию «теории оптимального добывания пищи» (Optimal Foraging Theory) (MacArthur,

Pianka, 1966; Charnov, 1976; Stephens, Krebs, 1986), которая играла заметную роль в экспериментальной трофологии и поведенческой экологии в течение последних десятилетий. При экспериментальной проверке теории на разных животных, в том числе и на рыбах, были получены результаты как подтверждающие основные ее положения (Mittelbach, 1981, Werner, Hall, 1988), так и существенно от них отклоняющиеся (Михеев, 1984; Bence, Murdoch, 1986). При изучении размерной селективности питания прогнозы делались на основе так называемых «статических моделей», в которых поведение рыбы описывалось константами, не зависящими от их мотивационного состояния. В дальнейшем было показано, что траты на «обработку» (handling time) и «выгодность» (profitability, P) жертв могут существенно меняться в процессе питания (Crooy, Hughes, 1991, Wanzenböck, 1995) и влиять на выбор пищевых частиц разного размера и, следовательно, на кривые селективности. Однако, экспериментальная проверка этого положения в широком диапазоне значений P , с детальной регистрацией выбора и потребления жертв разного размера до сих пор не проводилась.

В новом поколении моделей, получивших название «динамических» (Houston et al., 1988; Mangel et al., 1988), поведение животного в данный момент времени считается зависящим от результатов поведения в предшествующие моменты. Этот шаг сделал модели размерной селективности более реалистичными (Hirvonen, Ranta, 1996), но недавно полученные экспериментальные данные (Mikheev, Wanzenböck, in press) показали, что рыбы не оптимизируют размерный состав потребляемого корма только на основе максимизации скорости получения энергии. Опубликованные экспериментальные данные по питанию рыб позволяют предположить, что размерная селективность питания рыб, питающихся путем поштучного захвата, зависит не только от размерного состава и концентрации доступного корма, как считалось в статических моделях селективности, но также от присутствия хищников (Godin, 1990), конкурентных отношений (Milinski, 1982), и характера размещения (аггрегированности) корма (Mikheev et al., 1992; Михеев и др., 1997).

К настоящему времени накоплены многочисленные эмпирические данные по размерной селективности питания и большое число примеров несоответствия этих данных существующим моделям пищевого поведения. Это заставляет, с одной стороны, расширить круг факторов, учитываемых в моделях, а, с другой, исследовать в контроли-

руемых экспериментальных условиях динамику селективности на фоне меняющегося мотивационного состояния питающейся рыбы. Задачей данной работы является сравнительный анализ основных закономерностей размерной селективности питания рыб с учетом неоднородного размещения корма и различных аспектов мотивационного состояния рыбы.

Материалы и методы

Для того, чтобы экспериментально проверить предположение о зависимости размерной селективности питания от мотивационного состояния рыбы был выбран один из наиболее хорошо изученных с точки зрения экспериментальной трофологии и пищевого поведения объектов - молодь плотвы (*Rutilus rutilus* L.). Кормом служили традиционные в такого рода исследованиях организмы, *Daphnia magna*. Исследовалась индивидуальная динамика и селективность питания у сеголеток плотвы, полученных от одной пары производителей и выращенных в лаборатории.

Экспериментальная выборка рыб представляла собой унимодальную группировку с распределением, близким к нормальному. Средняя стандартная длина тела рыб (\pm - среднее квадратичное отклонение) составляла $26,9 \pm 2,3$ мм. Перед опытом рыбы не получали корм 24 часа.

Опыты проводили с отдельными особями в прямоугольных стеклянных аквариумах, содержащих 8 л воды. Через час после пересадки рыбы из выростного в экспериментальный аквариум туда добавляли смесь крупных (длина карапакса $1,95 \pm 0,21$ мм) и мелких ($0,90 \pm 0,20$ мм) дафний при концентрации 65 крупных и 130 мелких рачков в 1 л. Размер крупных дафний соответствовал оптимальному (обеспечивающему максимальный рацион) размеру жертв для плотвы данного размера (Wanzenböck, 1995). В течение 20 мин для каждой особи непрерывно регистрировали поедание мелких и крупных жертв. Для каждой рыбы опыт повторялся три раза в течение трех последовательных дней. Результаты однофакторного дисперсионного анализа не показали различий в соотношении потребления крупных и мелких жертв в разные дни ($F=1,48$, $p=0,24$), поэтому для каждой особи данные усреднялись по трем дням.

Результаты

На рис 1 показана динамика потребления крупных и мелких дафний наиболее мелкими и наиболее крупными рыбами в пределах экспериментальной группы. Несмотря на небольшие различия в размерах (коэффициент вариации длины тела по всей выборке был равен 8,5%), рыбы существенно различаются по соотношению потребления мелких и крупных жертв. Среди мелких рыб биомасса съеденных за 20 мин мелких дафний составила 45% от биомассы крупных дафний, а

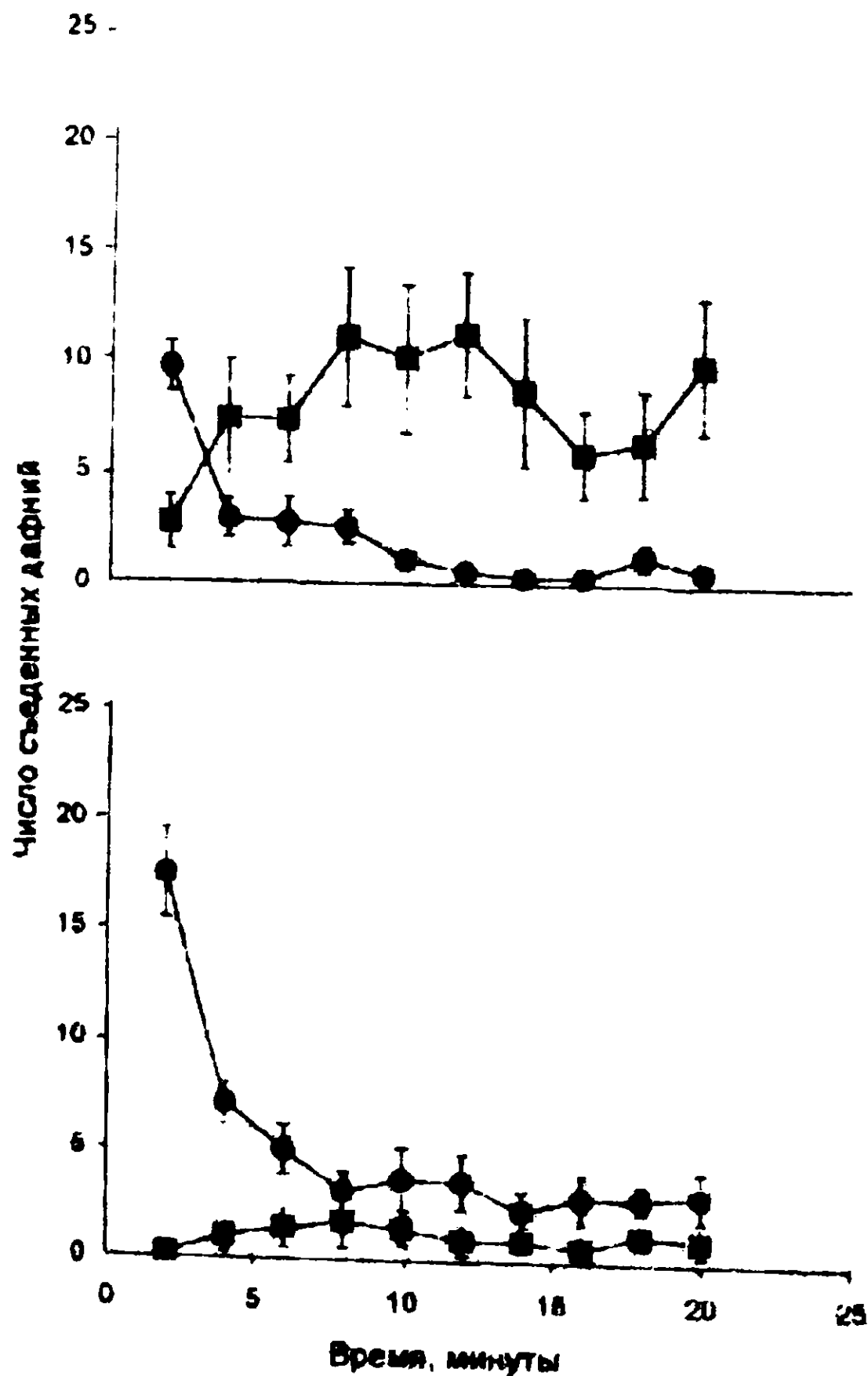


Рис. 1. Динамика потребления крупных (кружки) и мелких (квадраты) дафний мелкими (верхние) и крупными (нижние графики) особями плотвы. Даны средние значения и стандартные ошибки.

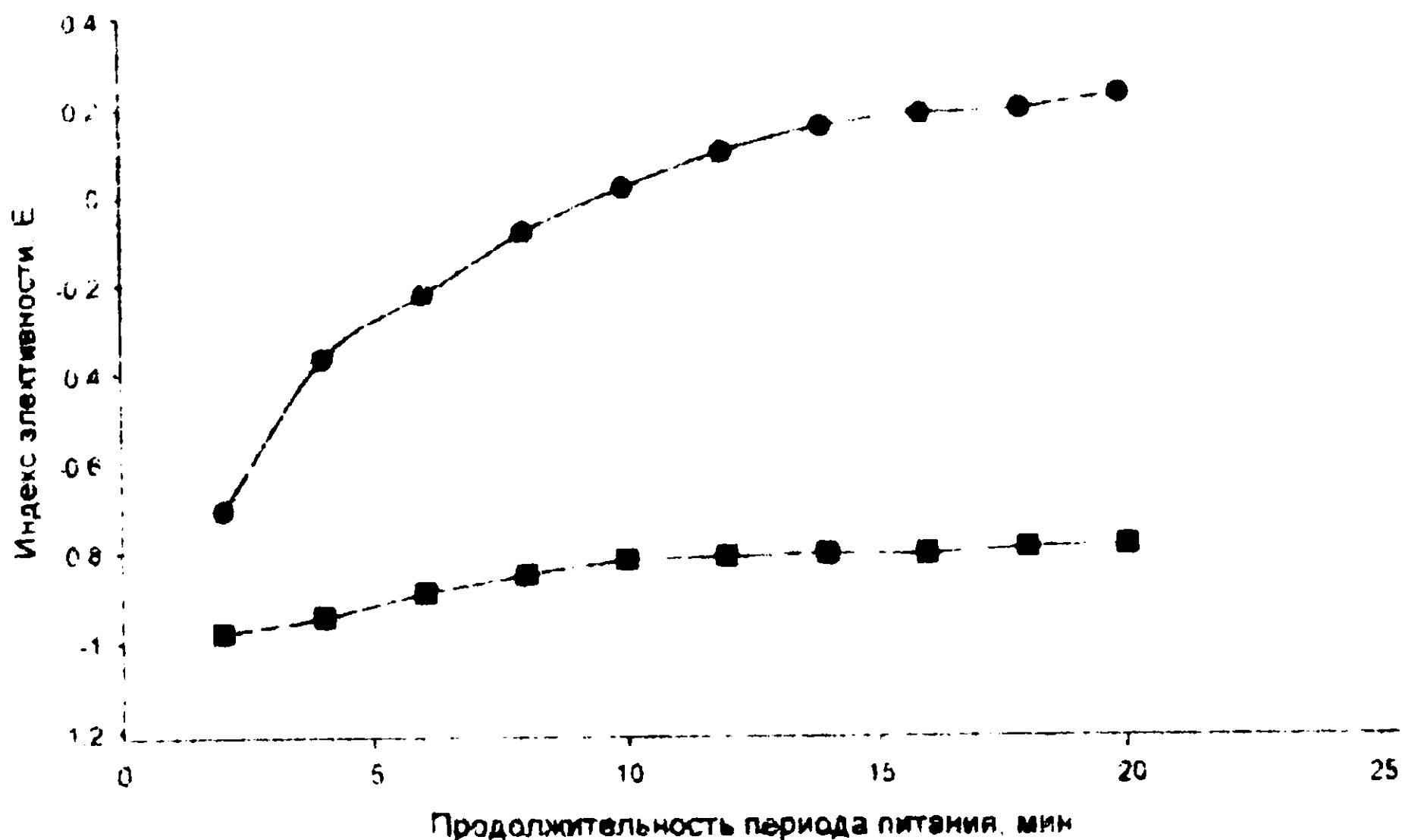


Рис. 2. Зависимости кривых элективности (индекс элективности Е: по Ивалеву, 1955) для мелких дафний от продолжительности эксперимента. Верхняя кривая — для мелких особей плотвы, нижняя — для крупных.

среди крупных — всего лишь 2%. Оптимальные размеры жертв для этих размерных групп плотвы соотносятся как 0,96 : 1,05, что свидетельствует о том, что все исследованные рыбы могли бы потреблять только крупных дафний для удовлетворения пищевых потребностей (до полного насыщения). Все рыбы начинали питание с крупных дафний и схватывали первую мелкую дафнию только тогда, когда их рацион достигал 1% веса тела рыбы. В группе мелких рыб это происходило в среднем через $83,5 \pm 51$ с после начала питания, крупных — через 210 ± 87 с (различия достоверны Т-тест: $p=0,046$).

При сравнении пищевого поведения мелких и крупных рыб обнаружены достоверные различия (при $p < 0,05$) по общему числу бросков, как на крупных, так и на мелких дафний, по числу съеденных крупных и мелких дафний, а также по числу крупных дафний, съеденных до начала потребления мелких.

По данным динамики потребления мелких и крупных дафний рассчитывали индексы размерной элективности для крупных и мелких рыб в зависимости от продолжительности периода питания (рис. 2).

Обращают на себя внимание два момента 1) существенные различия в показателях элективности у рыб разного размера, несмотря на то, что размеры рыб отличались не сильно, 2) элективность в высокой степени зависела от продолжительности периода питания, т.е. от мотивационного состояния хищника

Обсуждение

В условиях неоднородного размещения корма характеристики питания и, в частности, размерная селективность могут определяться частотой встреч со скоплениями кормовых объектов и величиной этих скоплений. Кроме того, большинство рыб, в первую очередь молодь, в процессе питания наиболее подвержены опасности стать жертвой хищников, а также подвергаются постоянному давлению конкурентов. Все эти обстоятельства представляются важными факторами, модифицирующими селективность питания рыб.

Полученные данные по динамике размерной селективности у исходно голодной молоди плотвы в пределах плотного скопления корма позволяют проанализировать характер кривых элективности в зависимости от мотивационного состояния рыбы, определяемого уровнем голода и зависящего от продолжительности питания в скоплении. Гипотетические кривые размерной элективности с разной асимметрией (рис. 3) могут быть получены с учетом динамики элективности в зависимости от продолжительности периода питания (рис. 1, 2). При кратковременном питании (около 5 мин.) кривая элективности будет иметь левостороннюю асимметрию (максимум смещен вправо, в область сравнительно крупных пищевых частиц). Чем продолжительнее питание, тем выше оказывается доля мелких частиц и максимум элективности, проходя через середину размерного диапазона жертв (симметричная кривая элективности), в итоге оказывается смещенным влево. Такая кривая элективности, указывающая на преобладание мелких жертв, характерна для типичных планктофагов (Ивлев, 1955). К сравнению кривых элективности у представителей разных трофических групп мы вернемся позже, а прежде остановимся на различиях в кривых элективности, вызванных мотивационным состоянием рыб (рис. 3). Данные, полученные на молоди плотвы, показывают, что голодные особи, попавшие в кормовое пятно, состоящее из жертв разного размера, предпочитают крупных жертв. По мере насыщения рыбы переключо-

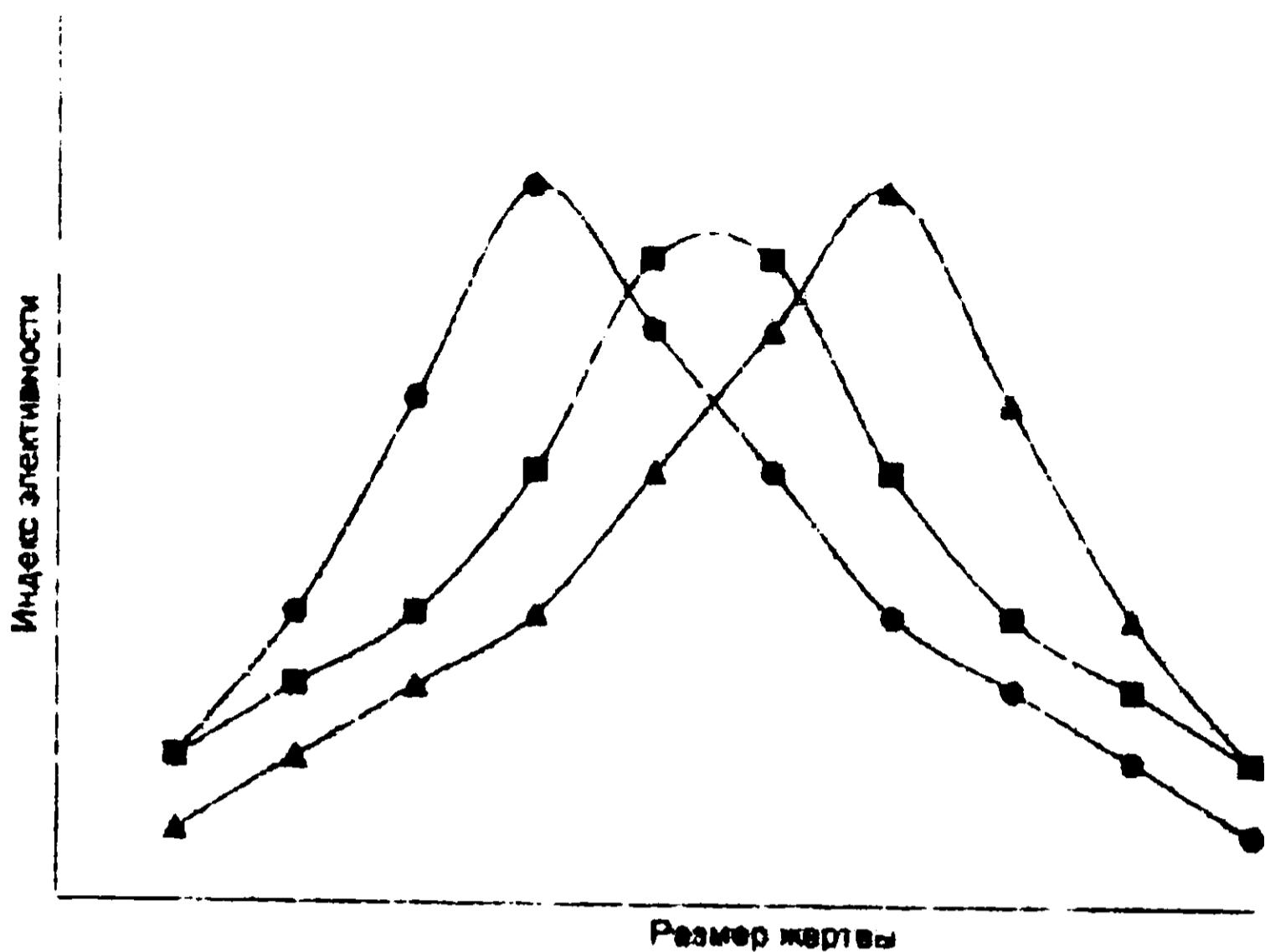


Рис. 3. Гипотетические кривые размерной элективности планктофага при разной продолжительности периода питания. Треугольники — кратко временно, квадраты — средней продолжительности, кружки — продолжительное (до насыщения) питание. Кривые построены на основе данных по динамике элективности у мелких особей плотвы, представленных на рис. 1.

чаются на мелких жертв, которые в категории относительно мелких рыб играют ведущую роль в рационе. Однако, в начале питания, до того как рацион рыб не достиг примерно 1% веса их тела, все без исключения рыбы потребляли только крупных дафний. Такое поведение можно расценивать как «стратегию максимизации получаемой энергии» (Stephens, Krebs, 1986), которая позволяет животным избежать гибели от голода. Вероятность оказаться голодными выше всего у рыб с относительно высокими энергетическими потребностями и низкой эффективностью пиццедобывательного поведения. В такой ситуации чаще всего, по-видимому, оказываются рыбы в раннем онтогенезе, вскоре после перехода на экзогенное питание. Данные по размерным спектрам питания, полученные на личинках плотвы, пойманных в естественных условиях (Михеев, 1984), косвенно подтверждают это предположение. На рис. 4 видно, что преобладание крупных жертв в наибольшей степени выражено у самых мелких особей. Другими сло-

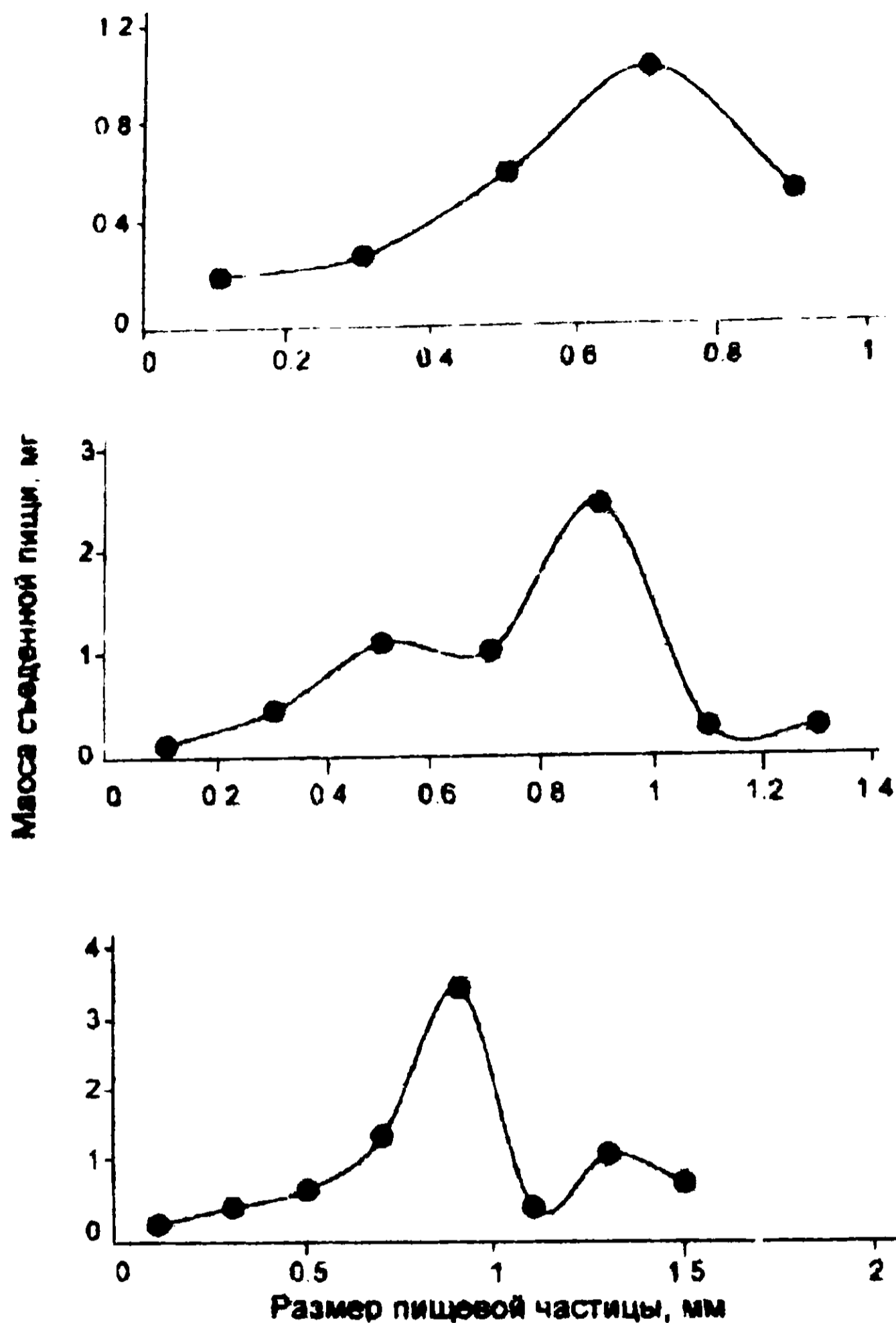


Рис. 4. Размерные спектры питания личинок плотвы, питавшихся в естественных условиях в плотном скоплении зоопланктона. Верхняя кривая – личинки мельче 15 мм, средняя – 15 – 18 мм, нижняя – крупнее 18 мм. (Михеев, 1984).

вами, у ранних личинок преобладающая мотивация связана с высоким уровнем голода, что заставляет их выбирать энергетически наиболее выгодных жертв. Однако, такое поведение делает их весьма уязвимыми для хищников (манипуляции с крупными жертвами занимают много времени и снижают эффективность оборонительного поведения),

Относительный индекс элективности

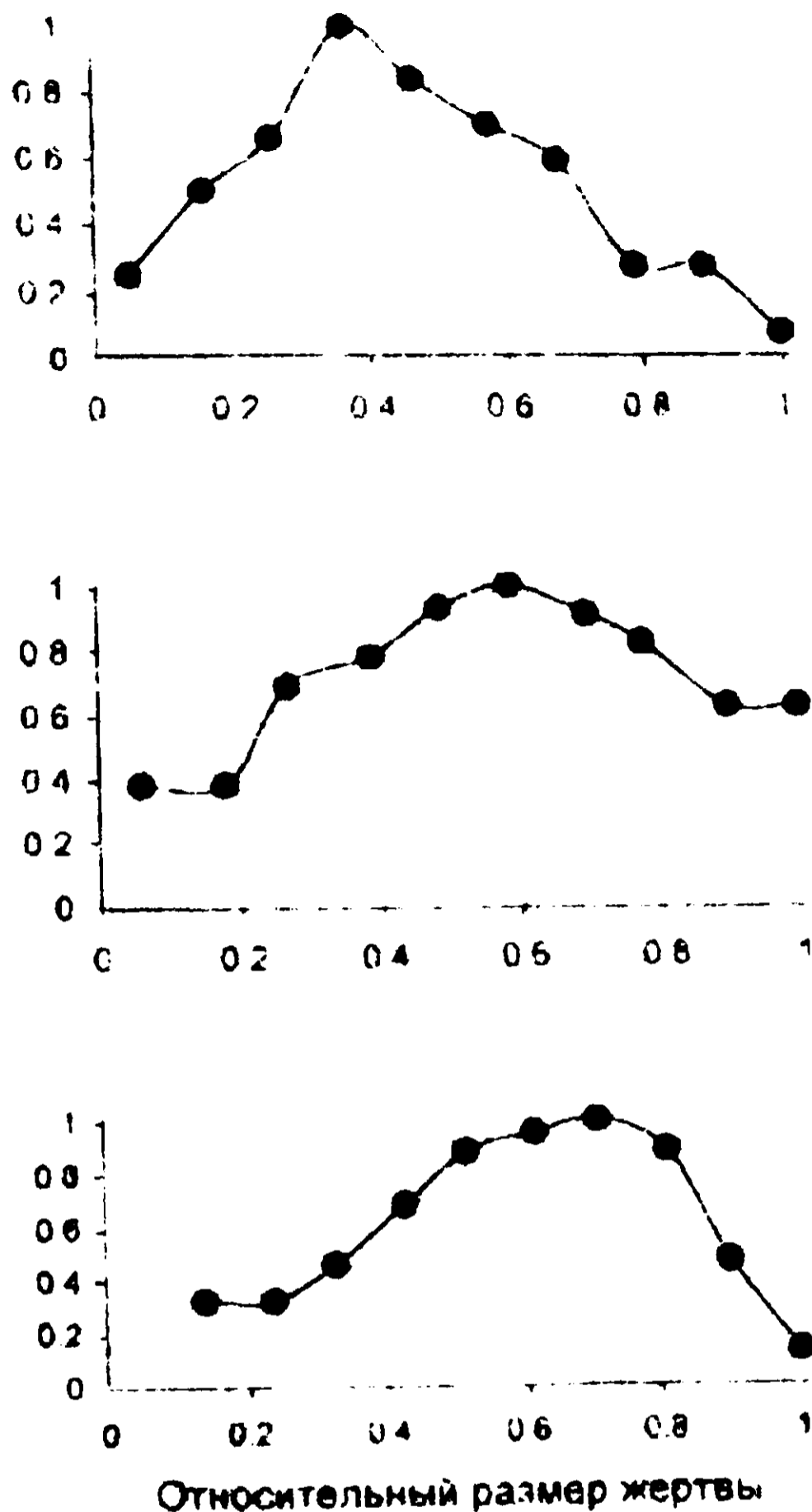


Рис. 5 Кривые размерной элективности для рыб разных профических групп. Верхняя кривая -- планктофаг (уклея), средняя -- бентофаг (каarp), нижняя -- ихтиофаг (щука). (Ивлев, 1955)

что подтверждается многочисленными данными о высокой смертности рыб в раннем онтогенезе. После того как наиболее острый голод утолен, молодь плотвы, по крайней мере часть из них (наиболее мелкие особи), переключалась на потребление преимущественно мелких жертв. Такое поведение давало меньшую скорость получения энергии, но требовало в несколько раз меньше времени на обработку жертв. Ве-

роятность быть съеденным при этом была существенно ниже (Godin, 1990). Более крупные особи плотвы включали мелких жертв субоптимального размера в свой рацион в очень небольшом количестве и продолжали потреблять крупных жертв до конца периода активного питания. Подобная тактика сопряжена с большим риском оказаться съеденным, но при этом обеспечивает более высокий рацион и скорость роста. Более крупные особи в среднем менее уязвимы для хищников, поэтому могут позволить себе пищевое поведение, которое сопряжено с большим риском. Кроме того, различия в селективности между мелкими и крупными особями плотвы могут быть связаны с отношениями доминирования-подчинения, сложившимися в условиях предшествующего содержания. Известно, что субдоминантные особи продолжают потреблять жертв субоптимального размера даже в отсутствие доминантов (Milinski, 1982).

Различная степень уязвимости для хищников в процессе питания может в значительной степени определять размерную элективность питания у рыб, принадлежащих к разным трофическим группировкам. Кривые элективности для планктофага уклей (*Alburnus alburnus* L.), бентофага карпа (*Cyprinus carpio* L.) и ихтиофага щуки (*Esox lucius* L.) (Ивлев, 1955), представленные на рис. 5, существенно отличаются друг от друга положением максимума. Щука предпочитает наиболее крупных жертв из диапазона доступных размеров, уклей – наиболее мелких, а карп – жертв промежуточного (среднего) размера. Относительный размер наиболее предпочитаемых жертв хорошо коррелирует с размером самого потребителя. В опытах В.С. Ивлева вес щук составлял в среднем 65 г., карпов – 4,3 г., уклеек – 2,6 г. Потенциальная уязвимость для хищников у уклей гораздо выше, чем у щуки. Следовательно, задача поиска компромисса между энергетической выгодой при питании и безопасностью для планктофага уклей стоит гораздо более остро, чем для ихтиофага щуки.

Заключение

Размерная селективность питания сфокусировала на себе целый ряд аспектов поведения рыб, связанных с принятием решений и выбором тактики поведения. Простые математические и экспериментальные модели размерной селективности в течение многих лет служили основным инструментом для проверки положений "теории оп-

тимального добывания пищи". Однако, ни статические модели оптимального питания, в которых основными переменными были концентрация и состав корма, ни динамические модели, в которых учитывалось меняющееся в ходе питания мотивационное состояние потребителя, не находили в полной мере экспериментального подтверждения.

В данной работе, кроме изменений уровня голода рыбы, которое в неоднородной среде может быть связано с агрегированным размещением корма, принимались во внимание другие аспекты мотивационного состояния, а именно давление конкурентов и хищников более высокого трофического уровня. Учет этих обстоятельств позволяет найти объяснение различиям в формах кривых размерной элективности у рыб разных трофических групп и разного возраста. Актуальной задачей является введение этих факторов в качестве переменных в модели размерной элективности питания. Основная проблема при этом связана со сложностью количественного выражения таких факторов как "давление конкурентов", "угроза со стороны хищников". Кроме того, как показали эксперименты с плотвой (Mikhnev, Wanzenbock, in press), рыбы даже в раннем онтогенезе заметно различаются в выборе компромисса между оборонительным и пищевым поведением. Даже среди рыб одинакового размера часть особей подвергает себя большому потенциальному риску, выбирая более крупных жертв; другая часть, утолив острый голод, переключается на жертв субоптимального размера, потребление которых позволяет поддерживать более высокий уровень бдительности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 96-04-48785), а также частичной поддержке Совета по грантам Президента РФ и государственной поддержки ведущих научных школ (проект 96-15-98020).

ЛИТЕРАТУРА

- Иванов В. С. Экспериментальная экология питания рыб. М. Пишпромиздат 1955.
- Михнев В. Н. Размеры потребляемых жертв и избирательность питания у молоди рыб // Вопросы ихтиологии. 1984. 24, 243-252.
- Михнев В. Н., Бобырев А. Е., Криксунов Е. А., Михнев А. В. Стратегии поиска корма мотодой рыб: исследование на математической модели // Вопросы ихтиологии. 1997. 37, 242-247.
- Bence J. R., Murdoch W. W. Prey size selection by the mosquitofish: relation to

- optimal diet theory // *Ecology*. 1986. 67, 324-336.
- Charnov E. L. Optimal foraging: attack strategy of a mantid // *American Naturalist*. 1976. 110, 141-151.
- Confer J. L., O'Bryan L. M. Changes in prey rank and preference by young planktivores for short-term and long-term ingestion periods // *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 1989. 46, 1026-1032.
- Croy M. I., Hughes R. N. Effects of food supply, hunger, danger of competition on choice of foraging location by the fifteen-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. // *Animal Behaviour*. 1991. 42, 131-139.
- Godin J.-G. J. Diet selection under the risk of predation. In: *Behavioural mechanisms of food selection*. NATO ASI Series, V. G20 (Hughes R. H., ed.). Berlin: Springer-Verlag. 1990, 739-769.
- Houston A., Clark C., McNamara J., Mangel M. Dynamic models in behavioural and evolutionary ecology // *Nature (London)*. 1988. 332, 29-34.
- Hirvonen H., Ranta E. Within-bout dynamics of diet choice // *Behavioral Ecology* 1996. 7, 494-500.
- MacArthur R. H., Pianka E. R. On optimal use of a patchy environment // *American Naturalist*. 1966. 100, 603-609.
- Mangel M., Clark C. W. *Dynamic modeling in behavioral ecology*. Princeton Univ. Press, Princeton. 1988.
- Milinski M. Optimal foraging: the influence of intraspecific competition on diet selection // *Behavioural Ecology and Sociobiology*. 1982. 11, 109-115.
- Mikheev V. N., Pavlov D. S., Pakulska D. Swimming response of goldfish, *Carassius auratus*, and the tetra, *Hemigrammus caudovittatus*, larvae to individual food items and patches // *Environmental Biology of Fishes*. 1992. 35, 351-360.
- Mikheev V. N., Wanzenböck J. (in press). Satiation-dependent, intra-cohort variations in prey size selection of age-0 roach (*Rutilus rutilus*) // *Behavioral Ecology*. 2000, (in press).
- Mittelbach G. G. Foraging efficiency and body size: a study of optimal diet and habitat use by bluegills // *Ecology*. 1981. 62, 1370-1386.
- Stephens D. W., Krebs J. R. *Foraging theory*. Princeton, New Jersey: Princeton Univ. Press. 1986.
- Wanzenböck J. Changing handling times during feeding and consequences for prey size selection of 0+ zooplanktivorous fish // *Oecologia*. 1995. 104, 372-378.
- Werner E. E., Hall D. J. Ontogenetic habitat shifts in bluegill: the foraging rate-predation risk trade-off. *Ecology*. 1988. 69, 1352-1366.

ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКОМОТОРНОЙ КОМПОНЕНТЫ РЕОРЕАКЦИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОЛОДИ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Молодь атлантического лосося продолжительное время развивается в быстротекущих реках (Смирнов, 1979; Шустов, 1983; Казаков и др., 1992), где одним из ведущих факторов внешней среды следует рассматривать поток воды. Установлено, что основной поведенческой реакцией рыб, обитающих в потоке, является реореакция. Она имеет врожденный характер, компенсирует снос рыб против течения и способствует сохранению района их обитания (Павлов, 1979). На фоне постоянного воздействия потока воды происходит развитие молоди лосося и развертывание разнообразных моделей поведения, реализующих пищевые, оборонительные, миграционные и другие жизненно важные функции (Веселов, 1996).

Следовательно, реореакция в онтогенезе молоди лосося может служить мерой отношения к потоку и быть ключом к раскрытию механизмов адаптации рыб к подвижной среде обитания на уровне поведения. К настоящему времени параметры локомоторной компоненты реореакции атлантического лосося практически не исследованы. В литературе имеются лишь отдельные сведения по плавательной способности и критическим скоростям течения (Jones, King, 1950; Щуров, 1981). В связи с этим, целью настоящей работы было экспериментальное исследование динамики показателей локомоторной компоненты реореакции в онтогенезе молоди лосося, а также сравнение их с физиологическим состоянием рыб и условиями обитания.

Материалы и методы

Работу выполняли в 1995 и 1996 годах на лососевых реках Варзуге (Кольский полуостров, бассейн Белого моря) и Лижме (Карелия, бассейн Онежского озера). Объектом исследования служила молодь лосося (*Salmo salar*) четырех возрастных групп: 0+, 1+, 2+, 3+, включавших стадии личинок, пестряток и смолтов.

Для изучения локомоторной реакции молоди лосося использовали гидродинамическую установку (рис. 1). Предварительно за трое суток перед проведением эксперимента емкости с рыбой термостатировали до необходимых температур (2, 6, 10, 14, 18, 24°C). Затем рыбу по одной помещали в камеру гидродинамической установки с соответствующей температурой воды. После 3-х минутной акклимации в течение 1,5 мин. начинали плавное ускорение потока воды от 0 до 160-200 см/с. При этом регистрировали следующие локомоторные показатели:

V_{min} - минимальная скорость течения воды, при которой возникала двигательная реакция рыб в виде нистагма глаз, изгибов тела или плавников. Затем следовала ориентация рыбы против течения;

V_{act} - средняя скорость течения воды, при которой пассивное сопротивление рыбы потоку воды сменялось на активное;

V_{max} - максимальная скорость течения воды, при которой рыба прекращала активное сопротивление потоку воды и сносились.

Повторность опытов – двух- и трехкратная. В каждом варианте опыта исследовалось 25-30 экземпляров рыб соответствующей возрастной группы. Данные обработаны статистически с использованием регрессионного метода.

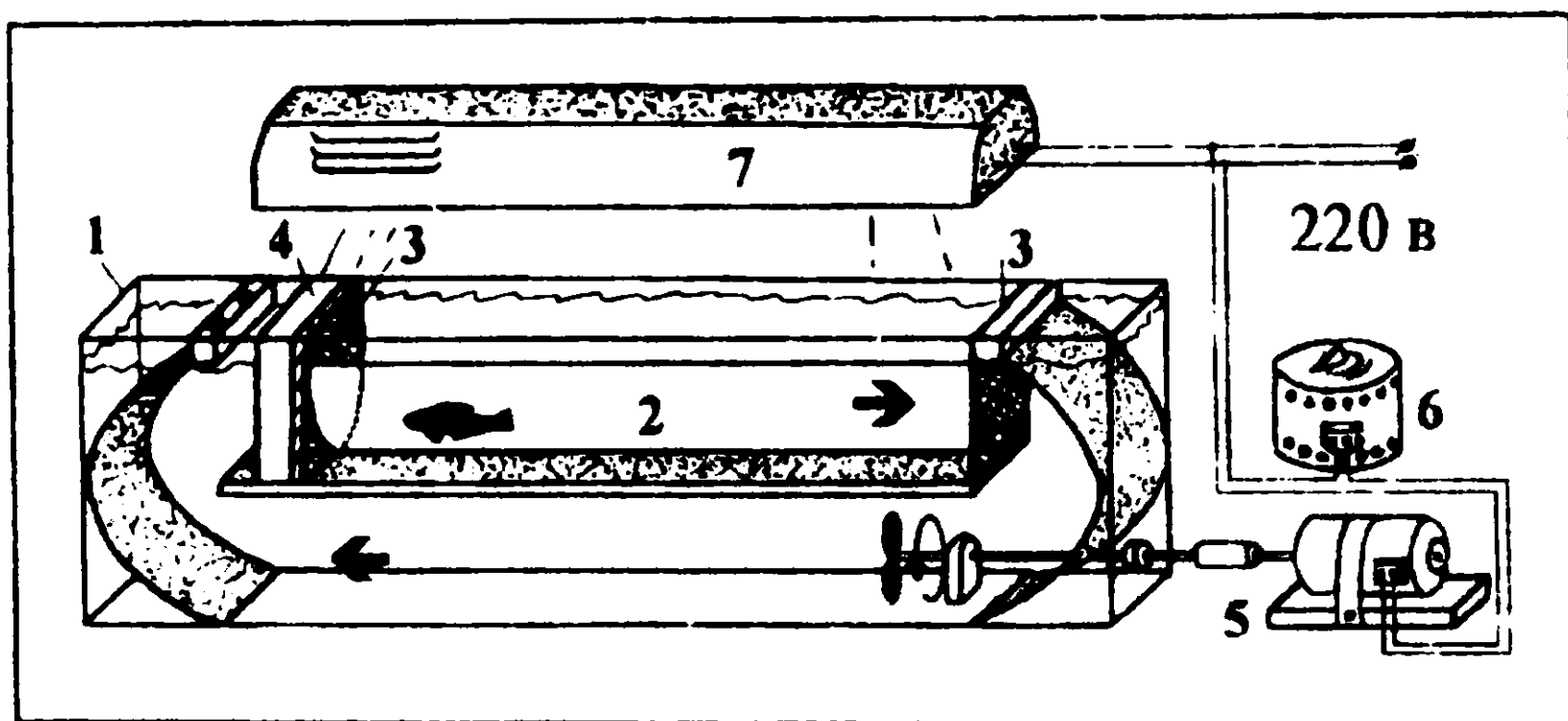


Рис. 1. Гидродинамическая установка для изучения показателей локомоторной компоненты реореакции молоди рыб: 1) емкость из оргстекла, 2) рабочая камера; 3) металлическая сетка; 4) ламинаризатор; 5) электромотор; 6) латр; 7) светильник.

Результаты

Исследование показателей локомоторной компоненты реореакции позволило выявить динамику их изменчивости в зависимости от линейных размеров рыб, т.е. в ходе их роста (рис 2).

Показатель V_{min} (табл., уравнение 1) имеет высокое значение у недавно вылупившихся личинок с еще не резорбированным желточным мешком ($L=2,3-2,6$ см). Затем, по мере роста личинок и перехода в стадию малька, происходит его достоверное снижение и длительная стабилизация, соответствующая двухлетнему росту пестряток от 4 до 8 см (возрастные группы 1+ и 2+). Переход пестряток на стадию смолта ($L=10,0-12,0$ см, возрастные группы 2+ и 3+) сопровождается резким повышением показателя V_{min} до максимальных значений.

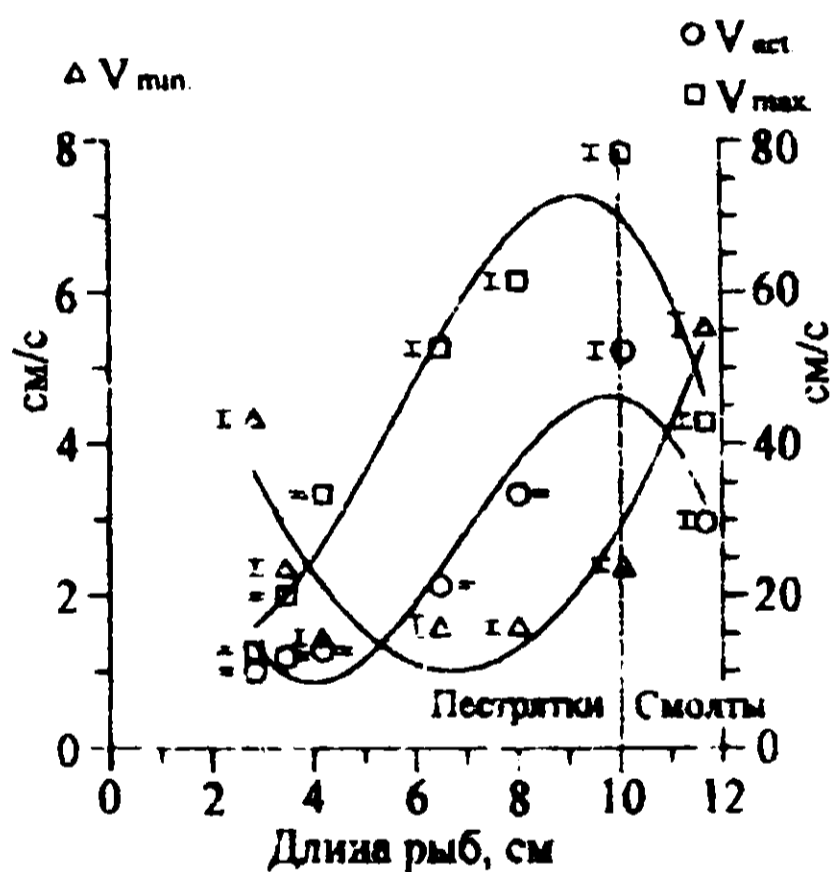


Рис. 2. Изменение показателей локомоторной компоненты реореакции в зависимости от длины молоди атлантического лосося

Показатель V_{act} (табл., уравнение 2) демонстрирует наименьшие значения для личинок и сеголеток лосося ($L=2,3-4,5$ см). Однако у пестряток старших возрастных групп ($L=6,5-10,0$ см) происходит его достоверный рост до максимальных значений. Процесс трансформации пестряток в смолтов вновь приводит к весьма резкому снижению показателя.

Минимальные значения показателя V_{max} (табл., уравнение 3) были измерены у личинок. Затем, вместе с увеличением длины используемых в эксперименте рыб также происходил почти линейный рост значений показателя, который достиг максимума у относительно круп-

ных пестряток ($L=10,0$ см) Смолтификация пестряток приводила к значительному снижению параметра V_{max} у смолтов

Исследованием зависимости показателей локомоторной компоненты реореакции от температуры установлено их динамичное изменение у пестряток разных возрастных групп (1+, 2+), возникающее при переходе от зимних к летним температурам и наоборот (рис. 3). Показатель V_{min} (табл., уравнение 4, 5) вне зависимости от возраста рыб имел максимально высокие значения зимой при температуре 2°C . Однако, при подъеме температуры происходило его достоверное снижение, причем особенно быстро в диапазоне до 10°C .

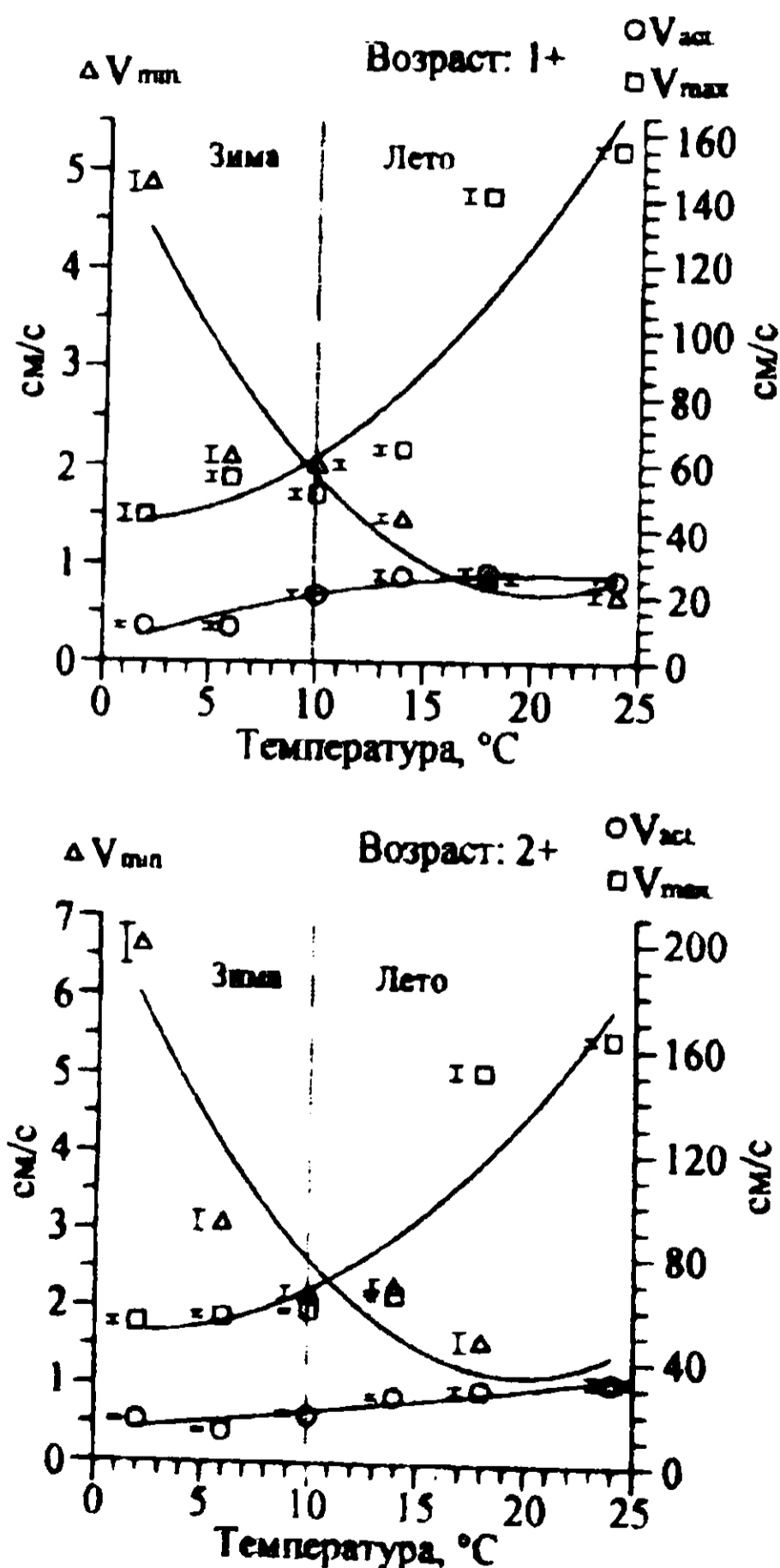


Рис. 3. Зависимость показателей локомоторной компоненты реореакции молоди атлантического лосося (пестрятки возраста 1+ и 2+) от температуры

Таблица

Уравнения зависимостей показателей локомоторной компоненты реореакции от длины рыб (L) и температуры (T).

№	Возраст	Уравнения	R ²
1	Все	$V_{min}=8.877-2.346*L+0.175*L^2$	0.80
2	группы	$V_{act}=86.054-44.911*L+7.916*L^2-0.383*L^3$	0.85
3		$V_{max}=30.616-17.865*L+5.396*L^2-0.322*L^3$	0.88
4	1+	$V_{min}=5.27-0.45*T+0.01*T^2$	0.90
5	2+	$V_{min}=7.15-0.6*T+0.015*T^2$	0.89
6	1+	$V_{act}=0.66+0.36*T-0.0088*T^2$	0.88
7	2+	$V_{act}=1.99-0.12*T+0.0013*T^2$	0.88
8	1+	$V_{max}=1.43-0.009*T+0.0075*T^2$	0.87
9	2+	$V_{max}=1.72-0.037*T+0.0087*T^2$	0.85

Одновременно с повышением температуры для исследуемых возрастов пестряток наблюдалось плавное возрастание значений показателей V_{act} и особенно V_{max} (табл., уравнение 6, 7 и 8, 9), которые достигали своих максимальных значений при температуре 24°C.

Обсуждение

Реореакция и длина рыб

Реореакция является основой поведенческих реакций речных рыб. Суть реореакции заключается в движении организмов против потока воды и в том, что все прочие поведенческие реакции разворачиваются на ее фоне. Реореакция состоит из ориентационной и локомоторной компонент поведения. Ориентация рыб в потоке происходит при помощи органов зрения, осязания и боковой линии (Павлов, 1979, 1986). Известно, что в процессе онтогенеза молоди рыб происходит развитие сенсорных органов и вместе с ними общей локомоторики. Можно предположить, что с этим процессом тесно связано развитие локомоторной компоненты реореакции у молоди лосося. Онтогенез многих видов рыб сопровождается постепенным увеличением пороговых и критических скоростей течения. Становление этих функциональных параметров идет неравномерно. Самые существенные изме-

нения происходят на первых этапах развития, особенно личиночном. Это объясняется интенсивным развитием морфологии тела, локомоторных органов, органов чувств и основных особенностей поведения (Васнецов и др., 1957, Алеев, 1963; и др.).

Рассмотрим изменение показателей локомоторной компоненты в связи с конкретными условиями обитания каждой возрастной группы молоди лосося. Весной личинки с уже резорбированным на $2/3$ желточным мешком начинают расселяться из нерестовых бугров на будущие участки обитания. Расселение происходит в грунте при низких скоростях течения и по различным направлениям, не связанным с главным потоком (Веселов, 1996). Это обстоятельство существенно, так как для личинок V_{min} имеет более высокие значения, чем для сеголеток и годовиков. Высокие пороговые значения показателя соответствуют слабой чувствительности личинок к потоку. Вместе с неразвитой локомоторикой это приводит к их пассивному вымыванию с порогов. Попадание личинок в топогидравлически благоприятные зоны порогов происходит случайно, большая их часть гибнет. С развитием экзогенного питания и появлением чешуйного покрова личинки переходят в стадию малька. Одновременно происходит смена микробиотопы: выход мальков из межгалечного пространства на поверхность грунта. В новом биотопе существенно усиливается воздействие потока на мальков. Соответственно у рыб развивается чувствительность к потоку и общая локомоторика: показатель V_{min} снижается, а V_{max} напротив, возрастает. Это означает усиление способности активного сопротивления рыб большей скорости потока, а в естественных условиях связано с освоением разнообразных топогидравлических ниш и мозаичным расселением по пороговым участкам с высокими скоростями потока. По-видимому, при малых линейных размерах рыб существенна относительно высокая вязкость воды как среды обитания. Поэтому становится важным точное реагирование на минимальную и максимальную скорость потока, позволяющее молоди удержаться на благоприятном по топогидравлическому режиму участке реки и реализовать развивающиеся особенности микростационарного территориального поведения (Веселов, 1996).

Дальнейший рост рыб ($L=4,0-8,0$ см, возраст 1+ и 2+) приводит к стабилизации показателя V_{min} . Однако, последующая трансфор-

мация пестряток ($L=10,0$ см) в смолтов вновь приводит к повышению V_{min} , т.е. снижению чувствительности к потоку. По-видимому, для более крупных рыб турбулентные потоки воды менее опасны. Если и произойдет снос пестрятки течением с микростации, то ее локомоторная активность вполне может это компенсировать. Для смолтов также нет необходимости четко реагировать на малейшие движения потока. Более того, отсутствие четкой реореакции должно способствовать свободному перемещению смолтов в толще воды и катадромной миграции. Уровень локомоторных показателей реореакции смолтов, по нашему мнению, достаточен для формирования стай и поддержания стайного поведения. Однако он недостаточен для территориального поведения на микростациях, что и определяет во время миграции одиночных или стайных смолтов проявление как старого микростационарного поведения, так и нового пелагического.

Параметр V_{act} почти точно повторяет динамику параметра V_{max} , только на более низком уровне. Очевидно, что чем крупнее пестрятка, тем более высокую скорость потока она может выдержать без включения активной локомоции. Соответственно в условиях реки пестрятка может без энерготрат длительно поддерживать охотничью позу ожидания, используя статическую работу плавников, особенно грудных (Webb, 1984a, 1984b; Казаков, Семенова, 1986).

Реореакция и температура

Для рыб, как и для других пойкилотермных организмов, хорошо изучена температурная зависимость скорости протекания биохимических и физиологических процессов (Строганов, 1962; Проссер, 1977). С этим связан малоподвижный образ жизни или оцепенение молоди лосося при низких температурах. Зимой главными избираемыми факторами становятся отсутствие воздействия сильного потока и наличие укрытий под крупными валунами (Saunders, Gee, 1964; Karlstrom, 1977; Gupjak, 1988; Веселов, Шустов, 1991). Это объясняется как высокими значениями V_{min} , так и низкими значениями V_{max} . Первый показатель соответствует слабой чувствительности к потоку, а второй свидетельствует о неспособности рыб при низких температурах прогнать сильный поток (Rimmer et al., 1985). Поэтому в

зимних условиях возникает общее снижение двигательной активности (Wankowski, 1981).

С повышением температуры, особенно выше 10°C , у молоди лосося значительно возрастает чувствительность к минимальной скорости потока. Включение активной локомоции происходит при более высоких скоростях, а это означает повышение экономичности двигательной активности. В температурном диапазоне $10-13^{\circ}\text{C}$ происходит весеннее перераспределение молоди лосося с зимних на летние микростанции и общее повышение локомоторной активности. По-видимому, начало миграции смолтов в реках Заполярья также определяется достижением определенных значений показателями локомоторной компоненты реореакции при температуре выше $10-13^{\circ}\text{C}$ (Веселов и др., 1998).

Заключение

В ходе онтогенеза и при смене сезонов года происходит динамичное изменение локомоторных показателей реореакции молоди лосося. Это определяет столь же динамичное отношение рыб к топогидравлическим условиям морфологически неоднородных участков рек. В природе происходит сезонное изменение картины мозаично-агрегированного заселения молодью лосося различных типов участков в зависимости от возраста рыб и развития локомоторных способностей.

Переход личинок на стадию пестрятки сопровождается повышением чувствительности к потоку и проявлением способности противостоять ему при более высоких скоростях. С ростом пестряток процесс усиливается, что позволяет им избирать микростанции в наиболее бурлящих участках порогов. В зимнее время способность выдерживать высокие скорости потока, как и чувствительность, резко снижаются. Молодь лосося вынуждена от воздействия потока скрываться в грунте.

При трансформации пестряток в смолтов происходит умеренное снижение чувствительности к потоку как и способности сопротивляться высоким скоростям потока. Уже при небольших скоростях смолты удерживаются в потоке только при активной локомоции. По-видимому, до момента трансформации пестряток в смолтов реореакция обеспечивала стабильное местоположение молоди на участке реки

и локальные сезонные миграции. После трансформации реореакция способствует изменению территориального поведения на пелагическое и формированию группового и стайного миграционного поведения

ЛИТЕРАТУРА

- Алеев Ю.Г. Функциональные основы внешнего строения рыб. М.: Изд-во АН СССР, 1963. 247 с.
- Васнецов В.В., Еремеева Е.Ф., Ланге Н.О., Дмитриева Е.Н., Брагинская Р.Я. Этапы развития промысловых полупроходных рыб Волги и Дона - леща, сазана, воблы, тарани и судака // Тр. Ин-та морфологии животных. АН СССР, 1957. 16. 12-32.
- Веселов А.Е., Шустов Ю.А. Сезонные особенности поведения и распределения молоди пресноводного лосося *Salmo salar* Sebago в реке // Вопр. ихтиол., 1991. 31. 346-350.
- Веселов А.Е. Модели поведения молоди атлантического лосося и условия их формирования // Препринт доклада. Петрозаводск, 1996. 50 с.
- Веселов А.Е., Казаков Р.В., Сысоева М.И. Особенности катадромной миграции атлантического лосося // В кн.: "Атлантический лосось". С.-Пб. "Наука", 1998. 242-265.
- Казаков Р.В., Кузьмин О.Г., Шустов Ю.А., Щуров И.Л. Атлантический лосось реки Варзуги. С.-Пб., 1992. 108 с.
- Казаков Р.В., Семенова О.Б. Морфологическая характеристика заводской и природной молоди семги *Salmo salar* L // Тр. Зоол. ин-та АН СССР, 1986. 154. 75-86.
- Павлов Д.С. Биологические основы управления поведением рыб в потоке воды. М.: "Наука", 1979. 319 с.
- Павлов Д.С. Миграции рыб во внутренних водоемах и их связь с течениями // Журн. общ. биол. 1986. 47. 173-182.
- Проссер С.Л. Температура // В кн. "Сравнительная физиология животных". М.: "Мир", 1977. 2. 84-191.
- Смирнов Ю.А. Пресноводный лосось (Экология, воспроизводство, использование). Л.: "Наука", 1979. 156 с.
- Строганов Н.С. Экологическая физиология рыб. М.: Изд-во МГУ 1962. 444с.
- Шустов Ю.А. Экология молоди атлантического лосося. Петрозаводск: "Карелия", 1983. 152 с.
- Щуров И.Л. Использование показателя "плавательная способность" для оценки качества заводской молоди семги // Биол. ресурсы Белого моря и внутр. водоем. Европейского Севера. Петрозаводск. 1981. 167-169.

- Gunjak R.A.* Behaviour and microhabitat of young Atlantic salmon (*Salmo salar*) during winter // Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1988, 45, 2156-2160.
- Jones J.W., King G.M.* Further experimental observations on the spawning behaviour of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) // J. Proc. Zool. Soc., 1950, 120, 317-323.
- Karlström O.* Habitat selection and population densities of salmon and trout parr in Swedish rivers // In: Information från Sötvattens-Laboratoriet. Drottningholm. 1977, 6: 72 pp.
- Saunders R.L., Gee I.H.* Movements of young Atlantic salmon in a small stream // J. Fish. Res. Board Canada, 1964, 21, 27-36.
- Rimmer D.M., Saunders R.L., Pain U.* Effects of temperature and season on the position holding performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Zool., 1985, 63, 92-96.
- Wankowski J.W.J.* Behavioural aspects of predation by juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on particulate, drifting prey // Anim. Behav., 1981, 29, 557-571.
- Webb P.W.* Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates // J. Amer. Zool., 1984a, 24, 107-120.
- Webb P.W.* Form and function in fish swimming // J. Sci. Amer., 1984b, 251, 58-68.

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИОННОГО
ПОВЕДЕНИЯ МОЛОДИ РЫБ, АККЛИМИРОВАННОЙ К
ПОСТОЯННЫМ И ПЕРЕМЕННЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ.**

Биологический факультет МГУ, Москва

В гетеротермальных условиях среды для рыб характерно терморегуляционное поведение, проявляющееся в перемещении животных и выборе ими определенной термальной зоны, соответствующей физиологическому состоянию организма. При этом скорость и направление перемещений в гетеротермальном поле, а также предпочтение той или иной температурной зоны у разных видов существенно различаются (Егу, 1947; Голованов, 1996). На величину окончательного температурного преферендума рыб оказывает влияние температура предварительной акклимации, физиологическое состояние организма, степень накормленности и другие факторы (Mac, 1985; Boltz et al., 1987; Константинов, Зданович, 1993; Свирский, 1996). При экспериментальных исследованиях влияния температуры акклимации на окончательный температурный преферендум, как правило, используются особи, длительное время содержавшиеся при постоянных температурах, хотя в естественных условиях реальны только переменные. В ряде работ показано, что в условиях осцилляции температуры, когда этот фактор среды колеблется в пределах экологической валентности вида с определенными амплитудой и частотой, отмечается повышение скорости роста рыб, улучшение их физиологического состояния и энергетики, наблюдается повышение резистентности к экстремальным воздействиям по сравнению с наблюдаемыми показателями при оптимальных постоянных температурах (Biette, Geen, 1980; Константинов, Зданович, 1986; Константинов и др., 1991). В связи с этим возникает вопрос о том, как скоро акклимированные к постоянным и переменным температурам рыбы в термоградиентном поле выберут зону конечных избираемых температур и будет ли различаться у них величина окончательной предпочитаемой температуры? Целью данной работы было изучение влияния постоянных и переменных температур акклимации на терморегуляционное поведение молоди рыб

В качестве объектов исследования использовали молодь карпа (*Cyprinus carpio*), золотой рыбки (*Carassius auratus*) и мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus*). Наблюдения за поведением рыб проводили в термоградиентном лотке из органического стекла (1,5 x 0,12 x 0,15 м), разделенного полуперегородками на 10 отсеков; при этом рыбы могли свободно перемещаться вдоль всего лотка. В термоградиентном лотке создавалась линейная градация температуры во всем ее задаваемом диапазоне. В лоток помещали трех-четыре рыб, но наблюдали за поведением одной особи (остальные – для большего приближения экспериментальных условий к естественным, поскольку подопытные рыбы – стайные). Средняя масса тилляпии, золотой рыбки и карпа составляла соответственно 0,16; 3,4 и 1,3 г. Наблюдения за поведением молоди рыб начинали после 2-4 недельной акклимации к постоянным или переменным температурам. В переменных терморегимах колебания температуры были близки к синусоидальным (период 24 ч), осуществлялись в пределах экологической валентности каждого вида и обеспечивались в автоматическом режиме (Зданович, Неделько, 1996). Параметры колебательных терморегимов были близки к наиболее оптимальным для роста и физиологического состояния молоди каждого изученного вида (Зданович, 1987). При переводе рыб из акклимационных температур в условия термоградиентного поля их помещали в отсек лотка, где температура соответствовала акклимационной. Сеансы наблюдений за поведением рыб в термоградиентном лотке проводили в течение 2-4 суток. Наблюдали за рыбами через 6-12 ч после их кормления, чтобы исключить влияние фактора накормленности на терморегуляционное поведение. Длительность каждого сеанса наблюдения составляла 15-20 мин. В это время каждые полсекунды, отмечали нахождение рыб в том или ином отсеке лотка. В итоге получали цифровую этограмму, описывающую все перемещения рыб во времени и в термоградиентном пространстве. На основе статистической обработки полученных результатов рассчитывали среднюю длительность разового пребывания рыбы в том или ином отсеке, число заплывов в каждый из них, среднеинтегральную преферентную температуру. Отмечали нижнюю и верхнюю границы термопреферентного диапазона, а также широту последнего. Статистическую обработку первичных данных проводили методом парных сравнений (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

После помещения в термоградиентный лоток молодь рыб, независимо от температуры акклимации, начинала довольно быстро перемещаться в отсеки лотка с более высокой температурой и в течение нескольких часов (обычно 2-4 ч) достигала температурной зоны, близкой к предпочитаемым температурам (рис. 1-3). При этом отмечаются значительные отличия в скорости перехода опытных рыб, акклимированных к постоянным и переменным температурам, из зон лотка, где температура соответствовала температуре акклимации, в отсеки лотка с более высокой температурой. Как видно на рисунках, молодь рыб, акклимированная к переменным температурам, совершала такой переход за 1-2 ч после помещения их в условия термоградиентного поля, тогда как рыбы, акклимированные к постоянным температурам, затрачивали на такой переход 3-4 ч. Обращает на себя внимание и то, что молодь исследованных рыб, содержавшаяся до опыта в условиях переменных температур, не только быстрее достигает зон лотка с более высокой температурой, но и занимает в них участки, где температура несколько выше по сравнению с наблюдаемой у рыб, акклимированных к постоянным температурам. Так, у молоди тилляпии, содержащейся при постоянных и переменных температурах, через 2 ч после начала опыта разница между средними интегральными преферентными температурами составляла 5°C , а у карпа и золотой рыбки через 1 ч после начала опыта соответственно $1,8$ и $1,2^{\circ}\text{C}$.

В последующие несколько часов нахождения рыб в термоградиентном лотке наблюдается постепенная стабилизация зоны предпочитаемых температур. При этом молодь исследованных рыб постепенно перемещается в зоны лотка, где температура соответствует конечным избираемым температурам. Однако, в этот период времени также наблюдаются существенные отличия в терморегуляционном поведении рыб, акклимированных к постоянным и переменным температурам. Молодь рыб, до начала опыта находившаяся при постоянных температурах, продолжает перемещаться в термоградиентном поле в сторону более высоких температур, тогда как рыбы, акклимированные к переменным температурам, начинают постепенно перемещаться в зоны лотка с температурой несколько ниже той, которую они выбрали в первые 1-2 ч (рис. 1, 2, 3). Через 5 ч после помещения рыб в условия термоградиентного поля разница между средними интегральными пре-

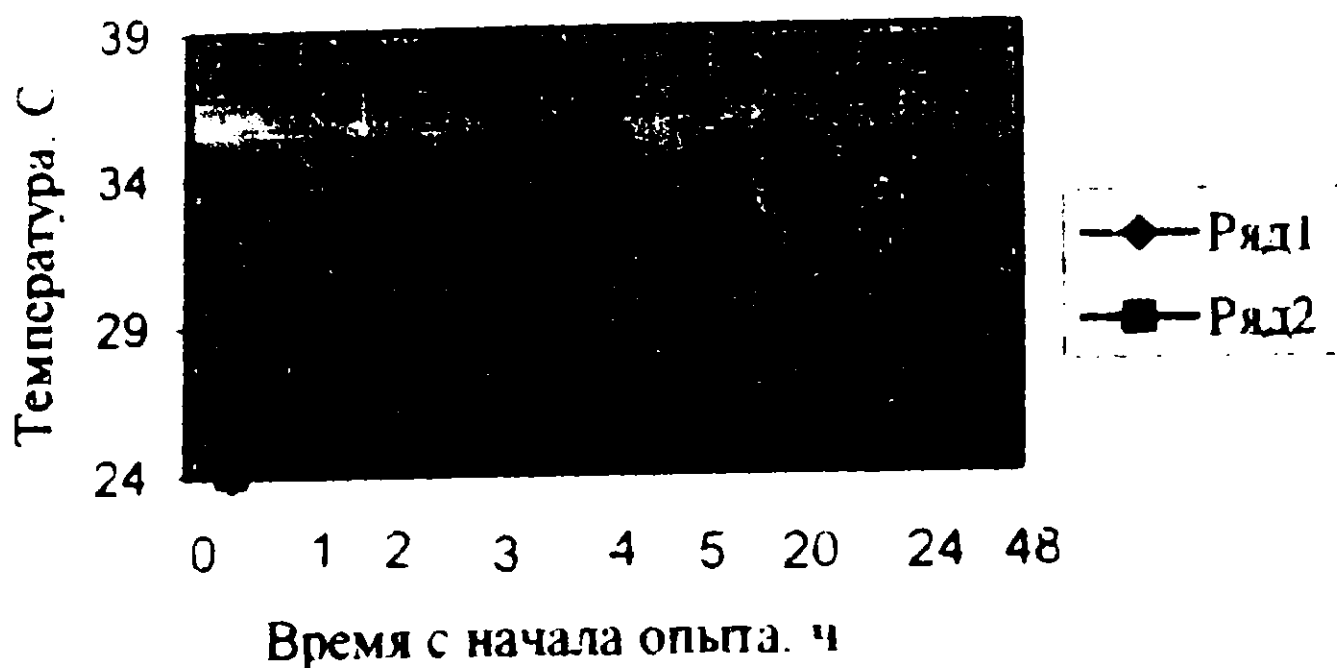


Рис 1 Температуры, предпочитаемые молодью мозамбикской тилляпии в зависимости от температуры предварительной акклимации (1- $25 \pm 5^\circ\text{C}$; 2- 25°C).

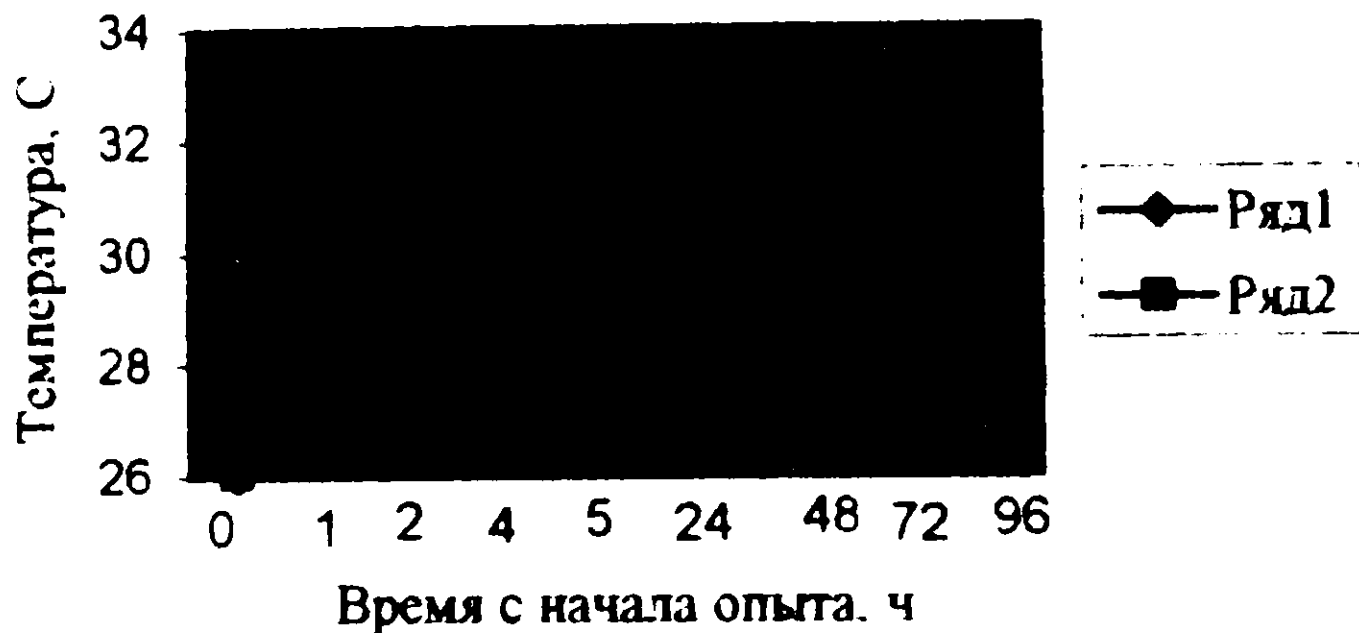


Рис 2. Температуры, предпочитаемые молодью тилляпии в зависимости от температуры предварительной акклимации (1 - $26 \pm 4^\circ\text{C}$; 2 - 26°C).

ферентными температурами тилляпии, золотой рыбки и карпа, акклимированных к постоянным и переменным температурам, составляла соответственно $2,0$, $1,3$ и $0,4^\circ\text{C}$. Наблюдаемые различия в предпочитаемых температурах у молоди исследованных рыб, содержащейся до опыта в условиях постоянных и переменных температур, отличались и в последующий период наблюдений. После 2-4 суток пребывания рыб в термоградиентном поле разница между средними интегральными преферентными температурами у молоди, акклимированной к постоянным и переменным температурам, составляла у тилляпии $2,0^\circ\text{C}$ ($P < 0,01$), золотой рыбки $1,6^\circ$ ($P < 0,001$) и карпа $0,5^\circ\text{C}$ ($P > 0,05$).

Достигнув определенной термальной зоны, соответствующей

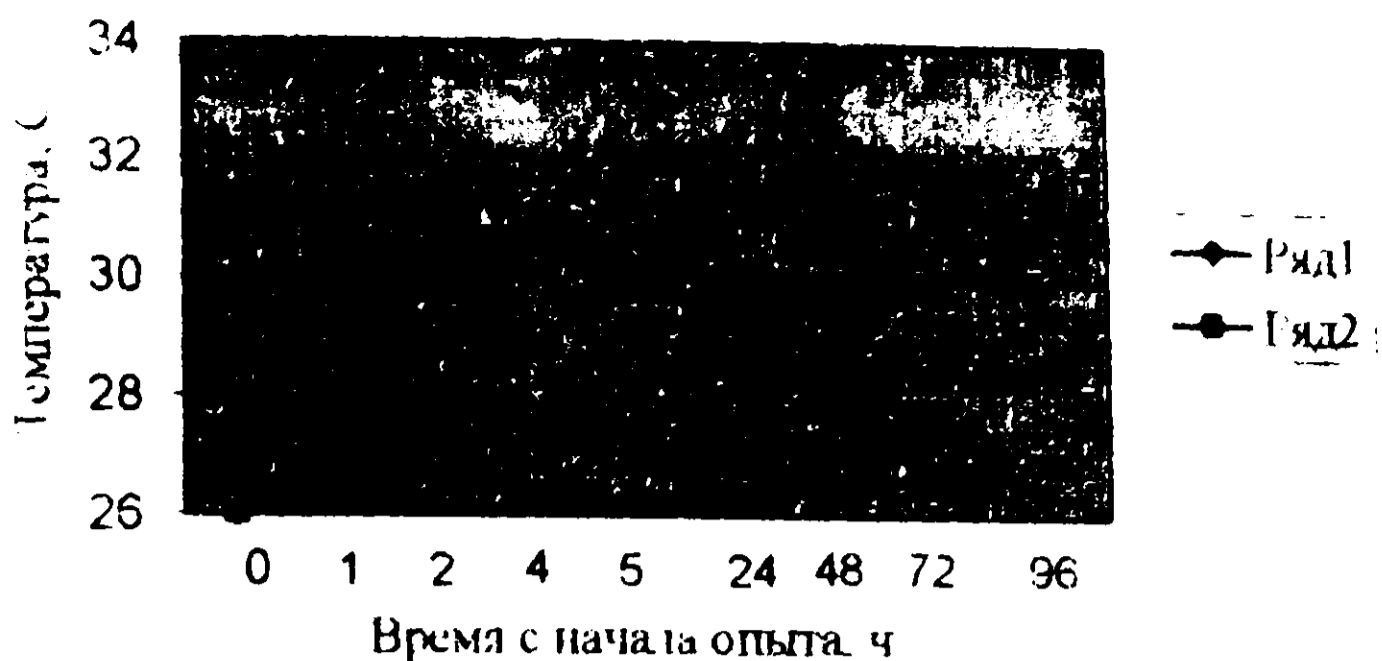


Рис. 3. Температуры, предпочитаемые молодью карпа в зависимости от температуры предварительной акклимации (1 – $26 \pm 4^\circ\text{C}$ 2- 20°C).

конечным избираемым температурам, рыбы не сосредотачиваются в каком-то узком его участке, а постоянно перемещаются в определенном температурном диапазоне, заплывая в зоны лотка, где температура несколько ниже или выше термопреферентной. Например, у японской ставриды *Trachurus japonicus* он достигает $10-13^\circ\text{C}$ (Furukawa et al., 1988), у разных видов корюшек – $20-25^\circ\text{C}$ (Lachance, Magnan, 1987), у молоди гольца *Salvelinus namaycush* – $10-14^\circ\text{C}$ (Mac, 1985), а у молоди белого амура, русского осетра и белого толстолобика он составлял $6-7^\circ\text{C}$ (Константинов, Зданович, 1993). В наших опытах рыбы перемещались в температурном диапазоне от 6 до 16°C , который для молоди каждого вида имел свои характерные крайние границы (табл. 1). Перемещаясь в пределах термопреферентного диапазона, молодь исследованных рыб наиболее часто и подолгу задерживалась в отсеках термоградиентного лотка, температура в которых соответствовала уровню конечных избираемых температур для каждого вида. Однако и здесь наблюдаются существенные отличия в особенностях терморегуляционного поведения молоди, акклимированной к постоянным и переменным температурам. У молоди рыб, содержащейся до опыта при переменных температурах, широта термопреферентного диапазона оказалась больше, чем у рыб, акклимированных к постоянным температурам. Так, у тиляпии наблюдаемое различие в широте термопреферентного диапазона составляет 5°C , у золотой рыбки – 5°C и у карпа 3°C . При этом расширение границы термопреферентного диапазона в большей степени происходит в сторону низких температур (табл. 1).

Таблица 1.

Некоторые характеристики термопреферентного поведения молоди рыб, акклимированной к постоянной и переменной температурам.

	Тилapia		Золотая рыбка		Карп	
	25° С	25°±5°С	26° С	26°±4°С	26°С	26°±4°С
Нижняя граница термопреферентного диапазона, °С	34	30	26	22	26	24
Верхняя граница термопреферентного диапазона, °С	40	41	37	38	37	38
Широта термопреферентного диапазона, °С	6	11	11	16	11	14
Интегральная преферентная температура, °С	37,2	35,2	31,4	29,8	31,5	31

Полученные результаты указывают на то, что терморегуляционное поведение молоди рыб может быть значительно модифицировано в зависимости от статичности или астатичности температурных режимов предварительной акклимации. У акклимированной к переменным температурам молоди исследованных видов рыб отмечается более быстрый переход в зоны термоградиентного поля с температурой близкой к преферентной, более широкий термопреферентный диапазон, более низкая интегральная преферентная температура по сравнению с наблюдаемыми у рыб, акклимированных к постоянным температурам. Более быстрое перемещение в термоградиентном поле рыб, акклимированных к переменным температурам, в зоны лотка с температурой, близкой к преферентной, можно объяснить их лучшим физиологическим состоянием и большей резистентностью к изменению температуры по сравнению рыбами, содержащимися до опыта в статичных температурных условиях (Зданович, 1987; Константинов, Зданович, 1986).

Использование переменных терморежимов при выращивании молоди рыб может не только ускорить рост и улучшить их физиологическое состояние, но и расширить термопреферентный диапазон, что очень важно при переводе выращенной молоди из искусственных условий в естественные

ЛИТЕРАТУРА

- Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты терморегуляционного поведения пресноводных рыб. В кн. «Поведение и распределение рыб», Борок. 1996, 16-40.
- Зданович В.В. Влияние осцилляции температуры на рост и физиологическое состояние молоди рыб// Автореф дис канд. биол. наук М. 1987. 24с.
- Зданович В.В., Неделько А.Г. Установка для исследования роста гидробионтов в переменном терморежиме // Гидробиол.журнал. 1996. 32, 76-80
- Константинов А.С., Зданович В.В. Некоторые особенности роста рыб при переменных температурах // Вопр. ихтиол. 1986. 26, 448-456.
- Константинов А.С., Зданович В.В. Некоторые характеристики поведения молоди рыб в термоградиентном поле// Вестн. Моск ун-та. Сер.16. Биология. 1993, 32-38.
- Константинов А.С., Зданович В.В., Шолохов А.М. Астатичность температурных условий как фактор оптимизации роста, энергетики и физиологического состояния молоди рыб // Вестн. Моск ун-та Сер.16. Биология. 1991. 38-44.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.. Высшая школа. 1990, 352 с.
- Свирский А.М. Поведение рыб в гетеротермальных условиях // В кн. «Поведение и распределение рыб». Борок. 1996, 140-152.
- Biette R.M., Geen G.H. Growth of underyearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under constant and cyclic temperatures in relation to live zooplankton size // Can.J.Fish Aquat.Sci. 1980. 37, 203-210.
- Boltz J.M., Siemien M.J., Stanffer J.R. Influence of starvation on the preferred temperature of *Oreochromis mossambicus* // Arch.Hydrobiol. 1987. 110, 143-146.
- Fry F.E.J. Effect of the environment on animal activity // Univ.Toronto Studies, Biol.Ser. N54. Publ.Ont.Fish.Res.Lab. 1947. N 68. 62 p.
- Furukawa A., Fukataki H., Tsuchida Sh. Temperature preference of horse mackerel, *Trachurus japonicus*, in a vertical temperature gradient // Environmental quality and aquaculture systems. NOAA Tech.Rep. NMFS. 1988. 69, 19-23.
- Lanchance S., Magnan P. Temperature preferences of three sympatric sticklebacks (Gasterosteidae) //Canad.J.Zool. 1987. 65, 1573-1576.
- Mac M.J. Effects of ration size on preferred temperature of lake charr *Salvelinus namaycush* //Env.Biol.Fish. 1985 14, 227-231.

ИЗМЕНЕНИЕ РОСТА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ РЫБ

**Всероссийский научно-исследовательский институт морского
рыбного хозяйства и океанографии. Москва**

Для животных характерен асимптотический рост, имеющий пределом некоторый дефинитивный размер. Половое созревание наступает как правило при массе тела меньше дефинитивной. Поэтому рыбы, погибающие после первого нереста (дальневосточные лососи, голомянки, угри), не достигают потенциально возможных размеров. Многие рыбы, особенно принадлежащие к облавливаемым популяциям, в большинстве или без исключения не доживают до возрастов достижения дефинитивного размера согласно статистике выживания. Возможно, что особи некоторых видов не доживали до таких возрастов никогда и их эволюция происходила на фоне такого «недоживания».

Характер роста рыб указывает на наличие различных влияний на темп деления клеток (гиперплазию) и увеличение размеров клеток (гипертрофию). Безусловное влияние на рост оказывают питание и температура обитания. При выраженной сезонности на кривую роста накладывается сезонная «квазисинусоидальность» (рис. 1), которая выявляется при детальном изучении роста рыб бореальных зон. Однако на скорость роста (прежде всего, на темп митотической активности) оказывают влияние и эндогенные механизмы, связанные с биологической целесообразностью той или иной скорости роста. Эти влияния, несомненно, осуществляются через гормональную соматотрофную систему, регулируемую внешними сигнальными воздействиями. Ниже приводятся примеры такого влияния, хорошо известные ихтиологам.

Замедленный рост молоди лососевых рыб в выростных водоемах и ускорение роста после ската. Отмечается после ската дальневосточных лососей с достаточно длительным пресноводным периодом жизни (нерка, кижуч, чавыча, сима), дальневосточных «радужных форелей» (камчатская семга, стальноголовый лосось, лосось Кларка), проходных «благородных лососей» (сёмга, проходная кумжа, каспийский лосось), проходных гольцов. При этом ускорение роста наблюдается как при скате в море (в солёную воду), так и при скате из речек в озёра (рис. 2) Нередки высказывания в том смысле, что после ската

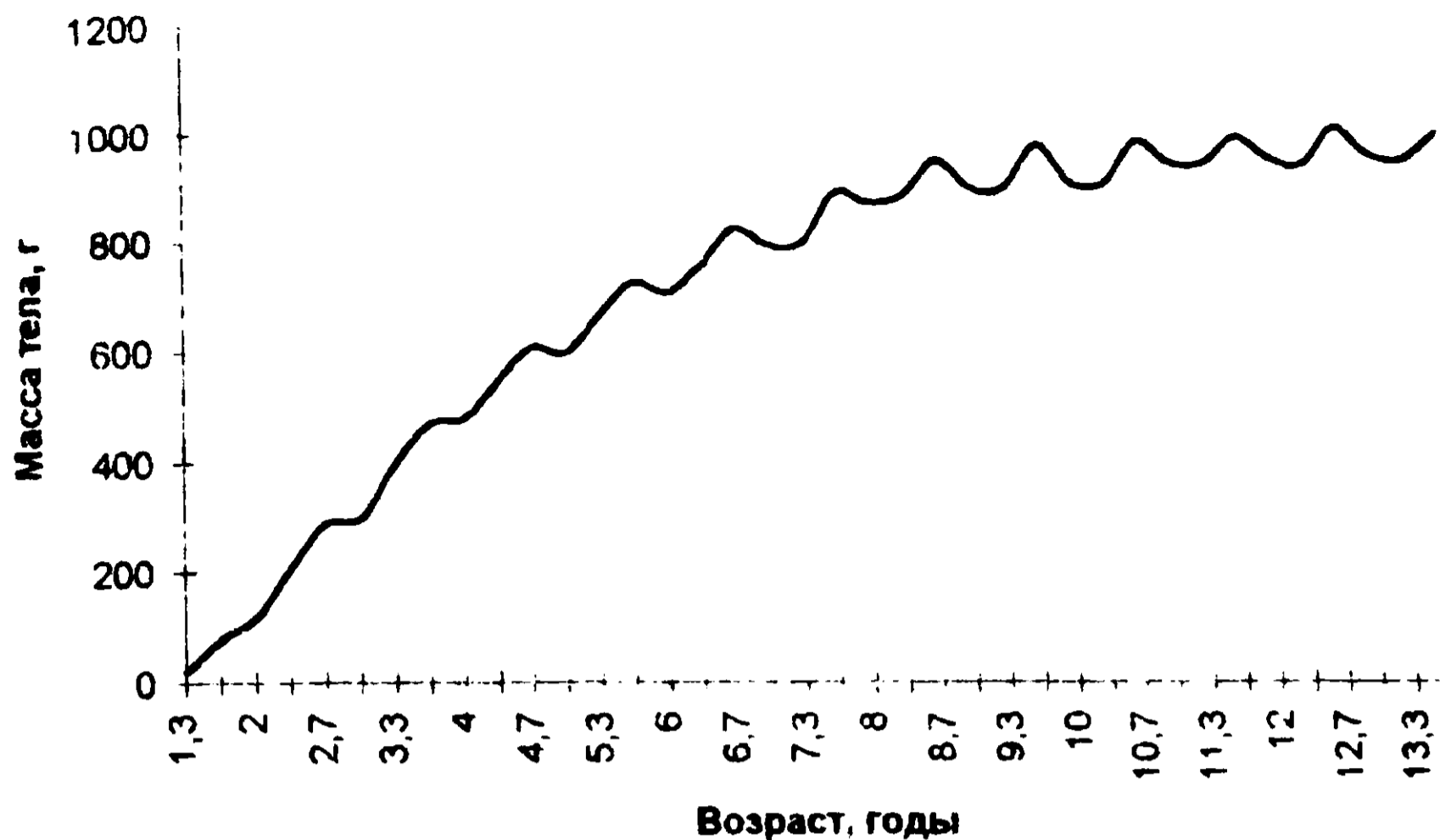


Рис. 1. Средние данные по весовому росту минтая залива Аляска (Hollis Megrey, 1989).

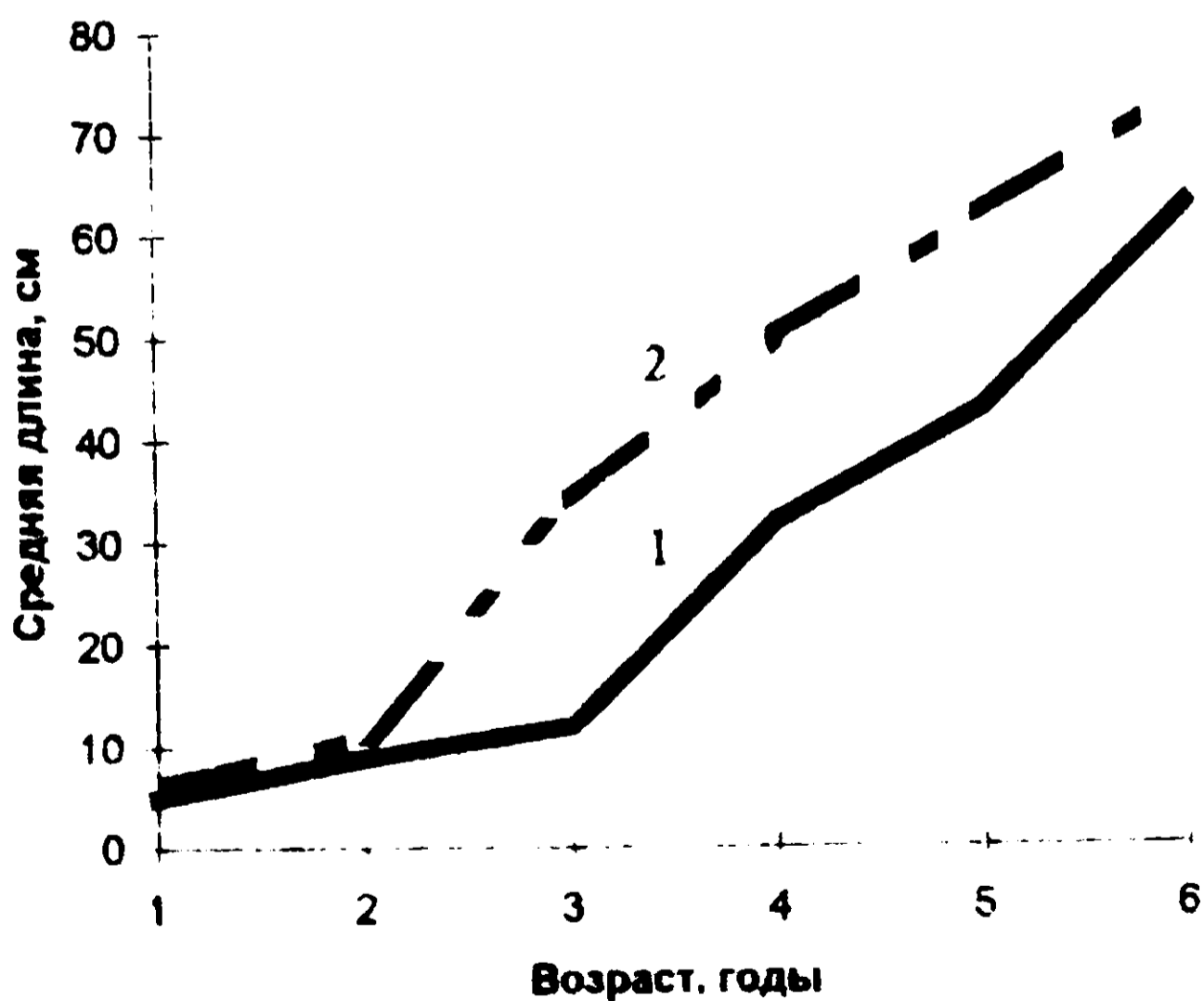


Рис. 2. Линейный рост озёрного лосося. Ускорение роста после ската из Пяльмы в Онежское озеро через три (1) или два (2) года жизни (Прокопьев, 1966)

лососи оказываются в более благоприятных кормовых и температурных условиях и что это является причиной резкого ускорения роста. На самом деле это определенно не так. Если сравнивать прирост мальков нерки, выращенных в идеальных кормовых условиях (Brett et al., 1969), с приростом нерки в море (рис. 3), то можно видеть, что при всех температурах выращивания прирост мальков при соответствующей массе тела ниже в пресной воде, чем в море. Следует заметить, что при доместикации радужных форелей для товарного выращивания происходит отбор исключительно быстро растущих особей, как считается, потерявших способность к замедленному росту.

Ускорение роста у некоторых особей речного окуня при переходе на питание крупной добычей. Такие факты описал Ле Крен (Le Cren, 1992). Некоторые особи окуня в озере Вандермир до 2-6-летнего возраста растут так же как остальные, обыкновенные особи, а затем начинают расти значительно быстрее (рис. 4). Такие особи редки в популяции озера (они составляют доли процента), но это весьма ценный элемент генофонда, достойный специального внимания.

Замедление роста при половом созревании у ряда мелких сельдеобразных - анчоусов, шпротов (рис. 5). До первого созревания черноморского шпрота зависимость весового роста от возраста описывается весьма крутой кривой $M_t = 17.3 T^{3.44}$, а после созревания более пологой линией $M_t = 7.5 T^{1.44}$ (Юрьев, 1979). В данном случае замедление соматического роста целесообразно в связи со значительной продукцией икры самками, но рост замедляется и у самцов, генеративные траты которых в несколько раз меньше.

Сдвиг в развитии гонад может у некоторых видов совпадать с повышением потенциальной способности к росту. Примером может служить рост созревающих в пресной воде жилых производителей некоторых видов дальневосточных лососей, которые в одном и том же водоёме растут значительно быстрее, чем молодь проходной формы, хотя и медленнее, чем проходная рыба в море (рис. 6).

Степенная функция часто удовлетворительно описывает рост рыб (Шмальгаузен, 1935). Она удобна для некоторых видов анализа роста. При рассмотрении данных в двойных логарифмических координатах степенная зависимость массы тела или длины от возраста представляет собой прямую линию, наклон которой определяется величиной показателя степени при символе времени. Рассмотрение в логарифмических координатах данных о весовом и линейном росте рыб

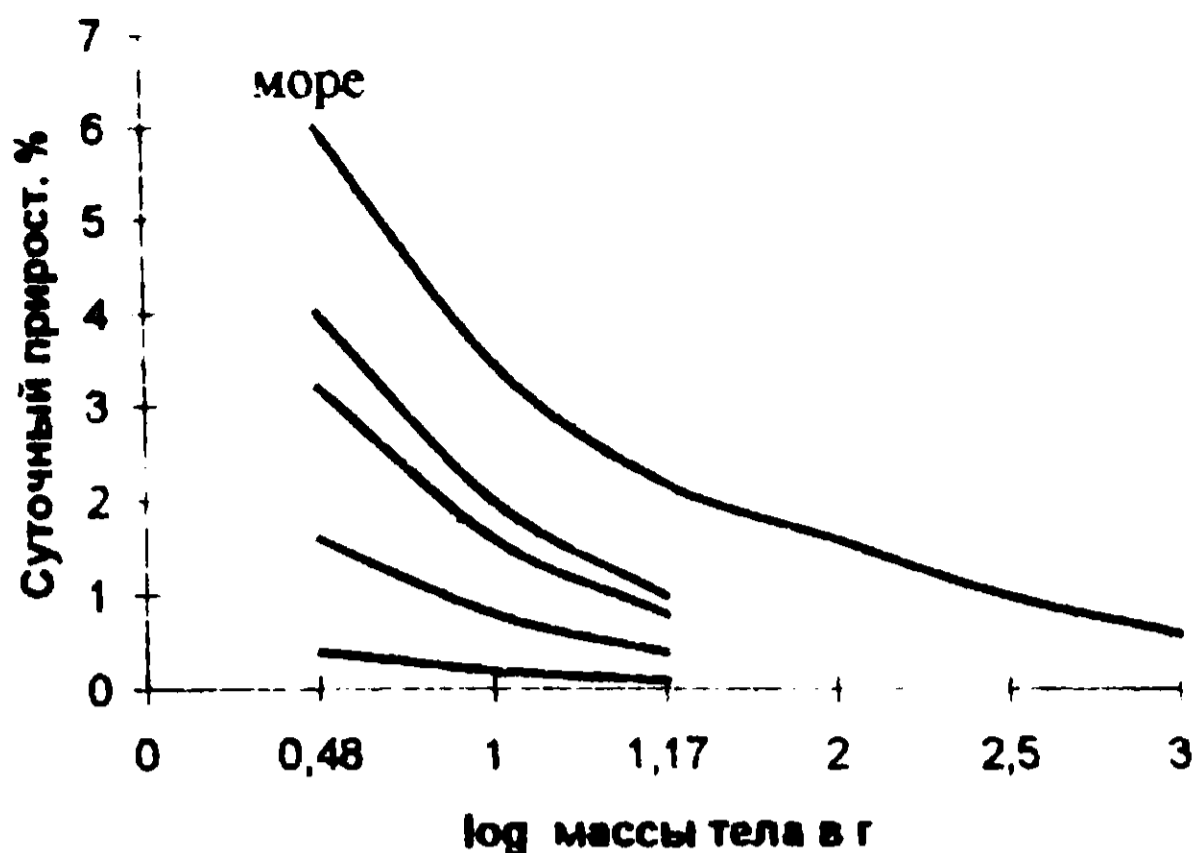


Рис. 3. Суточный прирост молоди нерки, питающейся по потребности при разных температурах по сравнению с ростом в море летом при 5 – 12°C (Brett et al., 1969).

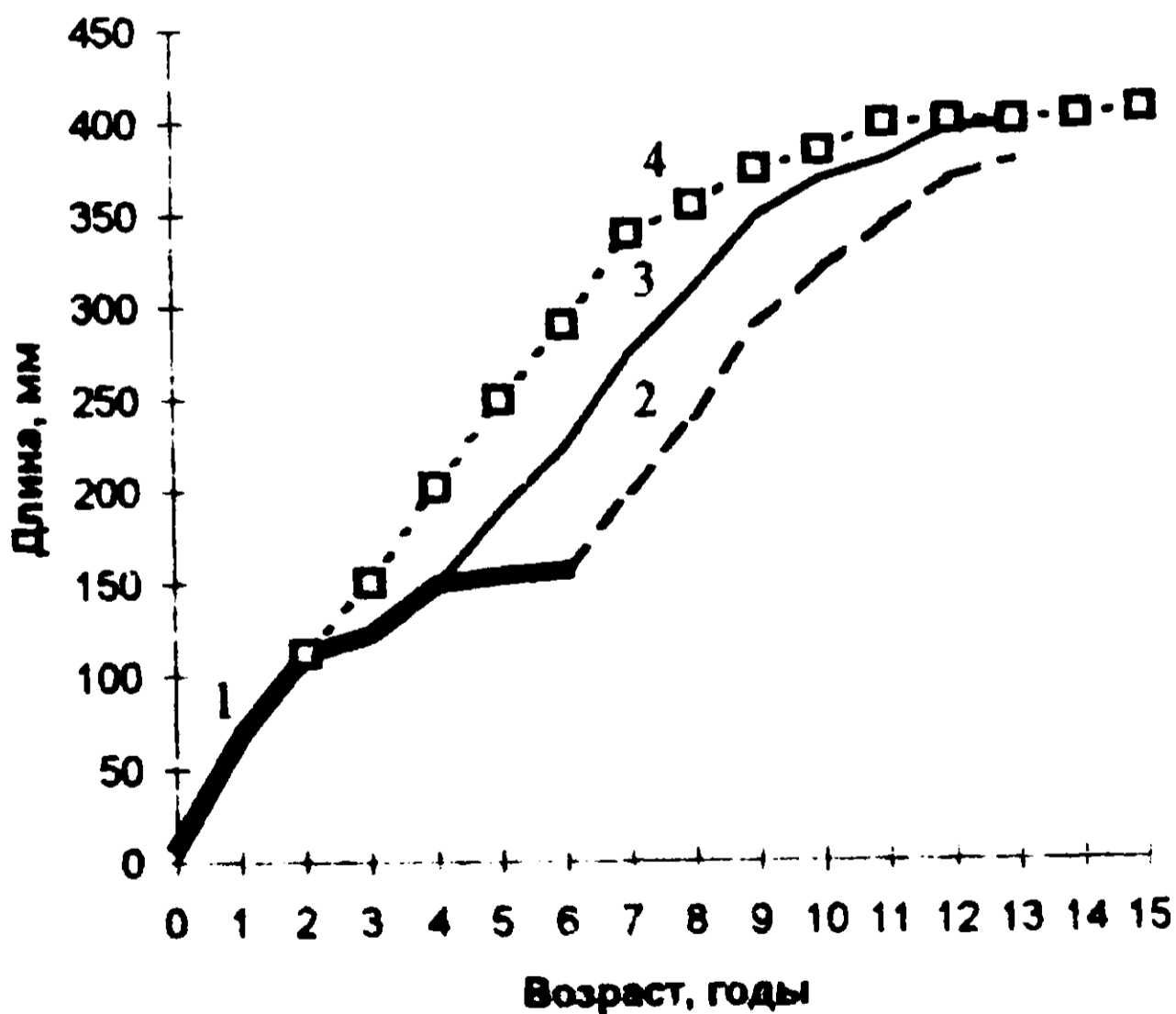


Рис. 4. Линейный рост очень крупных окуней в оз. Вандермир по данным обратного расчисления. 1 - рост до ускорения, не отличающийся от средних показателей, 2, 3, 4 - рост выдающихся особей (Le Cren, 1992).

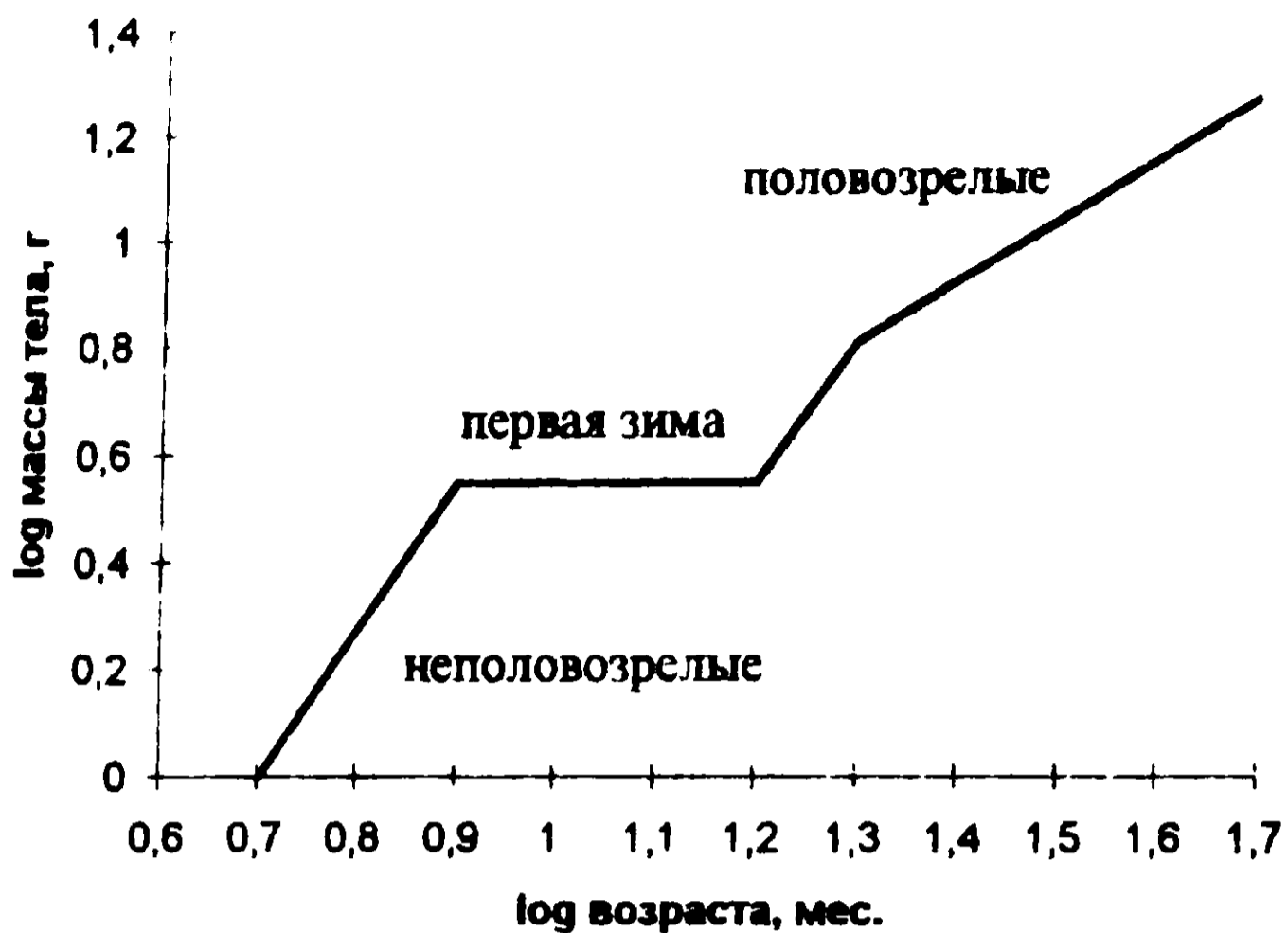


Рис. 5. Замедление весового роста черноморского шпрота после полового созревания (Юрьев, 1979).

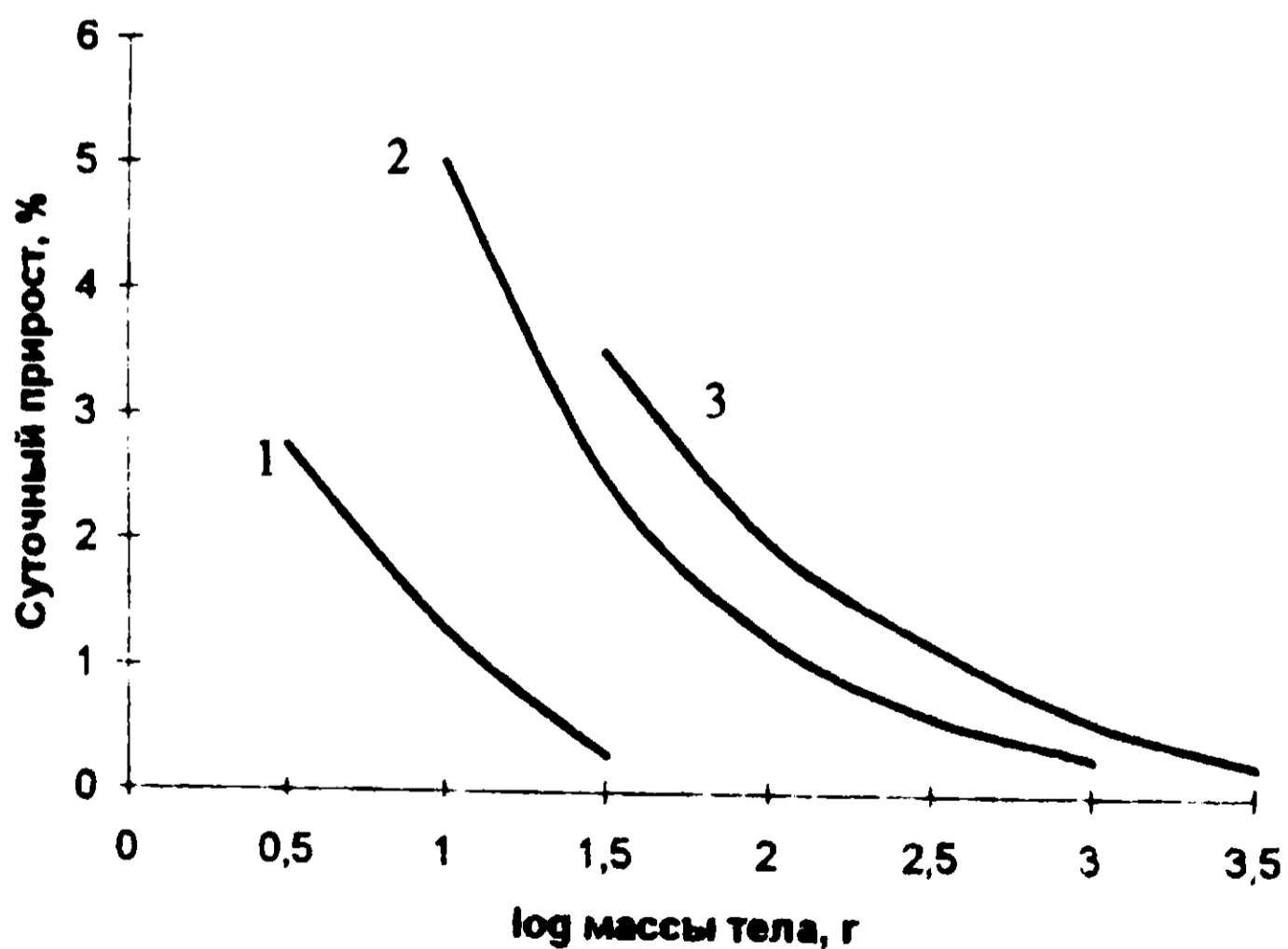


Рис. 6. Суточный прирост кижуча. 1 - молодь проходной формы, 2 - зимняя форма, 3 - проходная форма летом в море (Куренков и др., 1982).

позволяет сделать ещё одно важное предположение. Как известно, широко используемые для описания роста рыб формулы Берталяни, Гомпертца, Силлимана и др. постулируют постоянное замедление роста по мере приближения размеров и массы тела особей к дефинитивному пределу. Однако, анализ показывает, что отклонение от степенной зависимости происходит в непосредственной близости от «асимптоты» (Яржомбек, 1998).

Сопоставление вышеизложенных хорошо известных фактов заставляет сделать не вполне тривиальный вывод, что существуют физиологические механизмы, изменяющие не только реализацию скорости роста в пределах потенциальной способности к росту, но и саму потенциальную способность скорости роста. При этом потенциальная способность к росту может изменяться как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

ЛИТЕРАТУРА

- Куренков С.И., Горшков С.А., Толстык С.А. Распространение и биология пресноводного кижуча *Oncorhynchus kisutch*, Walbaum (Salmonidae) на Камчатке. *Вопр. ихтиол.*, 1982. 22, 85-99.
- Шмальгаузен И.И. Определение основных понятий и методика исследований роста. В кн.: *Рост животных*. М. Биомедгиз. 1935. 8-60.
- Прозорова М.И. Биология озёрного лосося р. Пяльмы (Онежское озеро). *Тр. Карел. отд. ГосНИОРХ*. 1966. 4, 85-99.
- Юрьев Г.С. Черноморский шпрот. В кн.: *Сырьевая база Чёрного моря*. М. Пищепромиздат. 1979. 73-92.
- Яржомбек А.А. Справочные материалы по росту рыб Тресковые рыбы. М. ВНИРО. 1998. 43 с.
- Brett J., Shelbourn J., Shoop C. 1969. Growth rate and body composition of fingerling sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* in relation to temperature and ration size. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 1969. 26, 2363-2394.
- Hollowed A., Megrey B. Gulf of Alaska walleye pollock population assessment and status of resource in 1989. In: *Condition of ground fish resource of Gulf of Alaska in 1989*. Seattle, 1989. 1-110.
- Le Cren E. Exceptionally big individual perch (*Perca fluviatilis* L.) and their growth. *J. Fish Biol.* 1992. 40, 599-625.

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

СИДОРОВ В.С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ ПРИ ВЛИЯНИИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ (ИСТОРИЯ ВОПРОСА И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ)

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

В последние три десятилетия широко используются различные группы биохимических показателей для оценки физиологического состояния рыб при влиянии самых разнообразных факторов среды (содержание кислорода, сезонность, температура, соленость, химические загрязнители и др.), хотя интерес ихтиологов к биохимическому тестированию рыб начал проявляться еще в начале XX столетия. К концу 70-х годов значительная часть литературного материала в этой области (более 3,5 тыс. источников) была собрана известным шотландским ученым М. Лавом, систематизирована и оценена с биологических позиций в монографии "The Chemical biology of fishes" (1970; 1980), первый том которой с некоторыми сокращениями переведен на русский язык (Лав, 1976). Следует отметить, что, будучи технологом и биологом, М. Лав не смог в полной мере интерпретировать разнообразнейшие данные в этой области с биохимических позиций. Сознавая это, а также критикуя тогдашнюю биохимию за игнорирование целостного подхода к организму и использование для биохимических исследований очень ограниченного числа организмов (мелкие лабораторные животные, кишечная палочка и др.), М. Лав специально не использовал в названии книги слова "биохимия", чтобы подчеркнуть иной подход к анализу биохимических данных, отличный от распространенной в то время биохимической парадигмы.

Следует отметить, что ихтиологам и экологам, использующим

в своей работе биохимические методы, такое игнорирование представителями отечественной биохимии активно развивающейся в нашей стране эколого-биохимической ветви ихтиологии и экологии, наверное, не представляется достаточно незаслуженным, так как за всю историю развития экологической биохимии и физиологии рыб в СССР и России, начиная с конца 60 годов (Первой Всесоюзной конференции по физиологии и биохимии рыб, в 1966 в Москве), до настоящего момента, практически ни разу официальная биохимия не протягивала руку помощи экологической биохимии рыб, за исключением отдельных случаев, связанных с активностью некоторых биохимиков.

Сейчас это отчуждение от фундаментальной биохимии могут почувствовать и многие специалисты-биохимики, занимающиеся другими частными проблемами биохимии (биохимией липидов, углеводов, веществ вторичного происхождения, растений, микроорганизмов, гормонов, технической, сравнительной и эволюционной биохимией, биохимией насекомых, биохимией питания, онтогенеза, старения, многих болезней, иммунитета, мозга и др.). В связи с этим вспоминается Всесоюзный съезд в Риге, когда ряд медицинских биохимиков выдвинули идею о разделении Всесоюзного общества, в состав которого входило около 10 тыс. членов, из которых около половины составляли ученые, занимающиеся медицинской биохимией, на два самостоятельных общества - медицинской и остальной биохимии. Тогда против этого предложения резко выступили корифеи отечественной биохимии (академики С.Е. Северин, А.Е. Браунштейн и др.); считая, что такое искусственное разделение биохимии нанесет непоправимый вред отечественной биохимии. Сейчас такое фактическое разделение биохимии сделали "благодарные" ученики этих корифеев. Какие бы аргументы не выдвигались при этом (нехватка денег, необходимость выдвижения приоритетных направлений и т.д.), все они не выдерживают строгой критики. Доказательством этого является Первый конгресс ихтиологов России, проведенный в сентябре 1997 года в Астрахани. На этот съезд были приглашены только делегаты, тем не менее были опубликованы все тезисы докладов, поступившие в адрес оргкомитета (1020 тезисов на 15 секциях, охватывающих все основные направления ихтиологии в нашей стране). Следует отметить, что в лучших традициях всесоюзных и российских съездов гидробиологического общества и на этом кон-

грессе была представлена секция по физиологии и биохимии уже не всех гидробионтов, а, прежде всего, рыб (90 тезисов)

Здесь уместно выразить признательность пионерам отечественной экологической биохимии рыб, в основном ихтиологам по исходному образованию (профессорам Н.С. Строганову, П.А. Коржуеву, Г.С. Карзинкину, которые пробудили интерес у многих биологов (ихтиологов, физиологов, генетиков, токсикологов) и пока еще у очень немногих биохимиков интерес к эколого-биохимическим проблемам ихтиологии. В основном усилиями этих ученых в нашей стране была положена традиция проведения Всесоюзных конференций по экологической физиологии и биохимии рыб: 1966 г., Москва, 1973 г., Москва, 1976 г., Киев, 1979 г., Астрахань, 1982 г., Севастополь, 1985 г., Паланга, 1989 г., Ярославль, последняя, восьмая в 1992 г. в Петрозаводске.

В области биохимии рыб накоплен огромный материал, который теоретически еще очень слабо проанализирован и осмыслен. Например, зачастую нет ясности того, по каким принципам отбираются отдельные биохимические тесты для оценки состояния рыб в конкретных экологических ситуациях. Чаще всего число этих тестов очень небольшое (5-10). И это в современный период развития биохимии, когда уже в значительной степени детализирована общая схема метаболических путей у позвоночных (на примере прежде всего некоторых лабораторных животных и человека), включающей несколько сотен низкомолекулярных метаболитов и несколько тысяч различных биополимеров (нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов, сложных липидов). Более того, показана высокая биохимическая специфичность отдельных органов и специализированных клеток, что позволяет им достаточно самостоятельно реагировать на различные экологические воздействия. Это вытекает и из патогенеза органов. Хорошо известно, что нарушение функций какого-либо органа до известных пределов слабо сказывается на функциональной активности других органов, т.е. организм способен в определенных рамках компенсировать нарушения деятельности отдельных его частей. В какой-то степени, использование в биохимическом тестировании физиологического состояния рыб очень небольшого числа показателей вытекает из широко распространенного мнения о том, что в живом организме все тесно взаимосвязано и поэтому какое-либо существенное изменение обмена веществ в одном

из его звеньев в том или ином органе или ткани обязательно скажется на состоянии метаболизма в любом другом его звене или органе. К сожалению, это весьма привлекательное и облегчающее труд мнение с нашей точки зрения, не соответствует действительности. Об этом свидетельствует и опыт медицины, в которой число используемых биохимических тестов для диагностики болезней из года в год увеличивается, достигая уже несколько сотен (Чиркин и др., 1992). По крайней мере, в качестве обязательного биохимического диагностирования в большинстве клиник страны используется до 15-30 биохимических показателей (в крови и моче), а за рубежом (в США и Японии) - около 70-100. Причем большинство этих показателей как бы выхвачены из сложнейшей схемы обмена веществ, тем самым обеспечивая надежность получаемых результатов, выявление направленности и глубины происходящих биохимических изменений. Для врача-практика это в какой-то степени оправдано: ему важно как можно быстрее и точнее по трафаретным схемам установить диагноз болезни, которую уже лечить по неоднократно стработанным в медицине рекомендациям. Кроме того, необходимо иметь в виду, что при диагностике болезней в медицине применяется, кроме биохимических, множество других методов диагностики. Создается впечатление, что многие используемые в ихтиологии биохимические тесты для оценки состояния рыб взяты из медицины без должного критического анализа их возможностей. Поэтому в настоящей статье и делается попытка выдвинуть некоторые требования к будущим теоретическим изысканиям в области экологической биохимии, а более узко - в области использования биохимических показателей для оценки физиологического состояния рыб под влиянием различных экологических факторов.

Во-первых, требуется провести тщательную инвентаризацию накопленного материала, который разбросан по многочисленным отечественным и зарубежным изданиям. Такая работа, с нашей точки зрения, полезнее не всегда осмысленного, к сожалению, накопления фактического материала, который продолжается со все возрастающими темпами как у нас, так и за рубежом. Такая инвентаризация должна быть проведена с использованием всех достижений информационной науки. Мы считаем, что в нашей стране биохимия рыб является частью ихтиологии, а не биохимии и представляется разумным некоторым

ведущим коллективам в этой области объединить усилия в данном направлении, начав с организации у себя объединенных картотек публикаций по экологической биохимии и передачи их друг другу.

Во-вторых, для того, чтобы в будущем было легче сравнивать результаты по экологической биохимии рыб, желательно установить единые правила взятия природного материала (размер выборки, обязательные органы, сезон года, возраст, стадия зрелости гонад, участки мускулатуры, печени, гонад, обязательные виды и др.), его доставки в лабораторию (в живом виде), методы фиксации, сроки и условия хранения. Хорошо известно, что все эти параметры иногда заметно влияют на многие биохимические компоненты, иногда делая невозможным сравнение материалов, полученных разными авторами.

В-третьих, особое внимание необходимо уделять выбору органов и тканей для эколого-биохимического анализа в зависимости от целей и задач исследования и природы изучаемого фактора. Чаще всего теоретическое обоснование такого выбора отсутствует. Большинство исследователей, изучающих биохимию, ограничиваются двумя, в лучшем случае, четырьмя органами (мускулатура, гонады, кровь, печень). Другие органы (жабры, почки, селезенка, кожа, спинной и головной мозг, внутренний жир, кости и др.) используются для эколого-биохимических целей крайне редко.

И последнее, на что хотелось бы обратить внимание, это необходимость создания системы биохимических показателей, с помощью которой можно было бы адекватно выявить не только происходящие изменения в биохимическом статусе и обмене веществ под влиянием различных факторов среды, но и оценить глубину и направленность происходящих биохимических изменений, а также те наиболее чувствительные места в обмене веществ, на которые в первую очередь и действуют эти факторы. С помощью этой системы исследователь должен легко отличать ранние и хронические изменения, а также по биохимическому следствию мог бы идентифицировать наиболее приоритетные факторы (например, наиболее сильные загрязнители) из множества действующих на организм рыбы. Необходимость такой комплексной биохимической системы оценки реакции организма на внешние воздействия стала нам особенно понятной после того, как мы приступили к изучению влияния на рыб природных вод, загрязненных

различными химическими веществами. Количество индивидуальных химических загрязнителей многих наших водоемов может достигать нескольких сотен и тысяч, а по данным АзНИИРХа даже десятков и сотен тысяч веществ. Естественно, система биохимического тестирования, состоящая из 10-15 показателей, не в состоянии оценить все возможные изменения в том сложнейшем биохимическом реакторе, состоящем из десятков тысяч индивидуальных и специфических биохимических компонентов, которым является живая клетка.

И хотя в нашей лаборатории использовалась достаточно многокомпонентная система биохимического тестирования, состоящая из более чем 100 показателей углеводного, энергетического, липидного, белкового и нуклеопротеидного обменов, нам обычно удавалось лишь констатировать сам факт изменений, иногда оценить степень их глубины, высказать возможные причины изменений, но ни разу ни одну из затрагиваемых проблем (катаракта у молоди лосося, некроз плавников у них же, различные гельминтозы, аэромонозы, расслоение мышц у осетровых, зимняя гибель молоди карповых и др.) хотя бы на биохимическом уровне не удалось решить полностью.

Ближайшей задачей является отбор из огромного набора существующих биохимических показателей и методов их определения наиболее важных тестов такой будущей рациональной комплексной системы эколого-биохимического тестирования рыб. Наша лаборатория могла бы закончить разработку нескольких таких блоков:

1. Оценка окислительного стресса. В литературе появляется все больше данных о важной роли соотношения свободных радикалов и других окислителей и антиокислителей для понимания процессов патологии. Избыток первых приводит к разрушению биомембран, нуклеиновых кислот, белков и т.д. Поэтому для оценки уровня окислительного стресса, который всегда может идти в органах рыбы при воздействии разных экстремальных факторов, необходимо определять основные компоненты, участвующие в окислительном стрессе (как окислители, так и антиокислители). В частности, интенсивность окислительного стресса мы определяем сейчас по перекисному окислению липидов (т.е. по малоновому альдегиду, который при этом образуется). Налаживаются методы определения свободных радикалов с помощью ЯМР. Желательно наладить определение оксигуанина-8 и оксоадени-

на-8 - продуктов окисления молекул ДНК. Кроме того, в лаборатории освоено определение антиокислителей - витаминов А и Е, окислительной активности по ДФПГ, субстратов окисления - полиеновых жирных кислот, йодного и кислотного числа, а также ферментов, участвующих в этом процессе (супероксиддисмутаза), налаживается определение активности пероксидазы и каталазы

2. Оценка общего адаптационного синдрома (стадии стрессовой реакции по Селье). В лаборатории применяли для этих целей радиоиммунное определение кортикостероидов и активности лизосомальных ферментов. Желательно наладить определение адреналина, глюкозы в крови рыб и некоторые другие специфические методы.

3. Оценка деградации и биосинтеза биополимеров и фосфорных эфиров. Оценка на основе белков: определение активности лизосомальных ферментов катепсинов В и D, эластазы, а также активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ - кальпаина I и II, получение хроматографических спектров (с использованием сефадексов, электрофореза в полиакриламидном геле) водорастворимых и мембранных белков, олигопептидов, определение общего белка по Лоури, свободного, пептидного и коллагенового оксипролина. Планируется наладить определение коллагеназы, специфических вторично модифицированных (на белках) свободных аминокислот, по содержанию которых можно судить о степени гидролиза некоторых белков.

По углеводам: α - и β -глюкозо- и галактозидазы, гиалуронидаза. Нужно наладить определение ряда субстратов и продуктов гидролиза.

По нуклеиновым кислотам: ДНКаза, РНКаза. Нужно наладить определение ДНК, РНК, олигонуклеотидов - продуктов их гидролиза.

По фосфорным эфирам: кислая и щелочная фосфатаза. Требуется наладить определение ряда их субстратов и продуктов гидролиза.

Вообще необходимо наладить определение каких-то общих тестов, характеризующих общую биосинтетическую активность клетки.

4. Оценка детоксикационной способности печени. Определение желчных кислот и холестерина в желчи, а также тионейнподобных пептидов. Желательно наладить определение цитохрома P_{450} , некоторых конъюгаз и металлотионейнов по радиоактивному кадмию

5. Оценка состояния органов по проницаемости их мембран и появлению в крови специфических для каждой ткани компонентов.

Известно, что во многих тканях и органах содержатся белки и некоторые другие вещества, характерные только для этих тканей. Для отдельных органов также свойственно специфическое соотношение некоторых изоферментов (например, ЛДГ для сердца и предстательной железы, креатинкиназы для сердца). По появлению в крови необычных для нее белков, изоферментных соотношений или других более низкомолекулярных веществ судят о появлении какой-то патологии в том или ином органе. Зачастую это связано с изменением проницаемости биомембран в этих органах, что может коррелировать и с увеличением в мембранах лизофосфолипидов, изменением в них соотношения фосфолипидов или жирных кислот. Для этих целей мы использовали определение соотношений в крови рыб изоферментов ЛДГ и МДГ, а также определение в органах лизофосфолипидов и других липидов.

6. Оценка изменений в генной регуляции обмена веществ в органах. Для этих целей использовали электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ, МДГ, супероксиддисмутазы, полуколичественную оценку активности каждого изофермента, а также изменение гетерогенной и полиморфной структуры этих ферментов у сравниваемых рыб под влиянием экологических факторов.

7. Оценка состояния энергетического обмена. В экологических исследованиях особенно важна суммарная оценка энергетического обмена в целом организме. К сожалению, используемое в нашей работе определение активности отдельных ферментов гликолиза (альдолаза, ЛДГ), цикла Кребса (МДГ), окислительного фосфорилирования (цитохромоксидаза и др.) не дают адекватного оценочного результата. В отдельных случаях хороший результат давало определение у сравниваемых объектов содержания запасных липидов (триацилглицеринов). Однако здесь не обойтись без таких широко используемых для этих целей коэффициентов (как для отдельных тканей, так и для целых организмов) как CO_2/O_2 , P/O_2 , отношение выделенного азота к поглощенному кислороду, отношение АТР к АДР+АМР и др.

8. Оценка нарушений и изменений в транспорте метаболитов. В этом аспекте в нашей лаборатории пока освоено определение различных групп сывороточных липопротеинов (ЛПНП, ЛПВП₁ и ЛПВП₂) и определение в них транспортируемых липидов – триацилглицеринов и жирнокислотных эфиров холестерина, а также их жир-

нокислотного состава. Определяется при этом холестериновый коэффициент атерогенности. Перспективным представляется определение в ЛПВП необычных жирных кислот (нечетных, низкомолекулярных), что, возможно, связано с различными патологическими процессами в тканях рыб. Важно в дальнейшем освоить метод определения активности лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ) и содержания жирных кислот в альбуминовой фракции.

Естественно, что предлагаемую систему биохимических показателей можно рассматривать лишь как очередной этап совершенствования будущей комплексной системы эколого-биохимического тестирования влияния различных экологических и антропогенных факторов на физиологическое состояние рыб. Безусловно, она будет намного эффективнее, если ее использовать в комплексе с другими химическими и биологическими методами оценки среды и здоровья обитающих в ней организмов.

Надеемся, что представленные рассуждения смогут стимулировать интерес коллег к участию в разработке такой системы и вызовут у них желание сотрудничать с лабораторией экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН в решении этой проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

- Богдан В.В., Смирнов Л.П., Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. Эколого-биохимическая система тестирования северных водоемов // Крупные озера Европы - Ладожское и Онежское. Петрозаводск. 1996, 105-106.
- Второй съезд биохимического общества Российской Академии Наук. Тез. стендовых сообщений. Пушкино. 1997. Ч. I и II, 575 с.
- Всесоюзное совещание по экологической физиологии рыб. Тез. докл. М. 1966, 146 с.
- V Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. Киев. Наукова Думка. 1982. Ч. I, II, III. 512 с.
- VI Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. Вильнюс. 1985, 578 с.
- VII Всесоюзная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. Ярославль. 1989. Т. I, II. 553 с.
- VIII научная конференция по экологической физиологии и биохимии рыб. Тез. докл. Петрозаводск. 1992. 220 с.

- Второй симпозиум по экологической биохимии рыб Ярославль. Тез. докл. 1990, 295 с.
- Возрастная и экологическая физиология рыб Борок. 1998 Тез. докл. 115 с.
- Дав Р.М. Химическая биология рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1976, 349 с.
- Лукьяненко В.И. Общая ихтиотоксикология. М. Пищ. пром-сть. 1983, 320 с.
- Лукьяненко В.И. Экологические аспекты ихтиотоксикологии. М., 1987, 240 с.
- Маляревская А.Я. Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного эвтрофирования водоемов. Киев Наукова Думка 1979, 254 с.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск. 1996, 103 с.
- Немова Н.Н., Рыжков Л.П., Филатов Н.Н. и др. Комплексная система мониторинга и тестирования водоемов // Биомониторинг и оценка повреждения организмов и экосистем. Петрозаводск. 1997, 147-148.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука. 1985, 175 с.
- Озернюк Н.Д. Механизмы адаптаций. М.: Наука. 1992, 272 с.
- Первый конгресс ихтиологов России. Тез. докл. М. Изд-во ВНИРО. 1997, 516 с.
- Первый симпозиум по экологической биохимии рыб. Ярославль. 1987 Тез. докл. 224 с.
- Романенко В.Д. Печень и регуляция межклеточного обмена (млекопитающие и рыбы). Киев. Наукова Думка. 1976, 183 с.
- Романенко В.Д., Арсан О.Д., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклиматизации рыб. Киев. Наукова Думка. 1991, 191 с.
- Сидоров В.С. К вопросу об эколого-биохимическом мониторинге // Первый симпозиум по экологической биохимии рыб. Ярославль. 1987 174-176.
- Сидоров В.С. Перспектива использования биохимического тестирования в водной токсикологии // V Всесоюзная конференция по водной токсикологии. М.: 1988, 72-73.
- Сидоров В.С. Использование биохимических показателей для оценки физиологического состояния рыб под влиянием различных факторов среды // Возрастная и экологическая физиология рыб. Борок. 1998, 97-98.
- Сидоров В.С., Немова Н.Н. Принципы и методы эколого-биохимического тестирования и мониторинга природных сред // Финно-угорский мир: состояние природы и региональная стратегия защиты окружающей среды. Сыктывкар. 1997, 158-159.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г. Перспективы использования биохимических методов регистрации экологических модуляций // Экологические модификации и критерии экологического нормирования. Труды международного симпозиума. Ленинград. Гидрометеоиздат 1991, 264-277.
- Сидоров В.С., Рыжков Л.П. Принципы физиологического и биохимического

- тестирования при мониторинге // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Севера. Петрозаводск 1995, 224-226.
- Сидоров В.С., Немова Н.Н., Смирнов Л.П. и др.* Новая рациональная система эколого-биохимического тестирования и мониторинга водоемов. // Биоиндикация и оценка повреждений организмов и экосистем. Петрозаводск. 1997, 147-148.
- Сидоров В.С., Такшеев С.А.* Некоторые принципы эколого-биохимического мониторинга водоемов. // Проблемы экологии Прибайкалья. Иркутск. 1988, 16.
- Сидоров В.С., Такшеев С.А., Немова Н.Н. и др.* Принципы и методы эколого-биохимического тестирования водоемов. // Экология и охрана окружающей среды. Пермь. 1995. 15-16.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Кирилюк С.Д., Такшеев С.А.* Принципы и методы эколого-биохимического мониторинга водоемов // Биохимия экто- и эндотермных организмов в норме и при патологии. Петрозаводск. 1996. 5-27.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Лызлова М.В.* К вопросу об эколого-биохимическом мониторинге северных водоемов // Биологич. ресурсы Белого моря и внутр. водоемов Европейского Севера. Сыктывкар. 1990, 15.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г.* Некоторые принципы и методы эколого-биохимического мониторинга // Второй симпозиум по экологической биохимии рыб. Ярославль. 1990, 223-225.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Лызлова М.В., Иванова Р.П.* К вопросу об эколого-биохимическом тестировании и мониторинге водоемов // Вестн. Днепропетр. ун-та. Биология и экология. Днепропетровск. 1993. 1, 183-184.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Лукьяненко В.И. и др.* К вопросу об эколого-биохимической диагностике состояния водоемов // Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб. Ярославль. 1997, 107-110.
- Сидоров В.С., Юровицкий Ю.Г., Немова Н.Н.* К проблеме выбора рациональной системы биохимической диагностики патологического состояния у рыб // Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб. Ярославль. 1997, 119-122.
- Сорвачев К.Ф.* Основы биохимии питания рыб. М. Пищ. пром-сть. 1982. 247с.
- Чиркин А.А., Огороков А.Н., Гончарик И.И.* Диагностический справочник терапевта. Минск. "Беларусь" 1992, 688 с.
- Шатуновский М.И.* Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М. Наука. 1980, 283 с.
- Шульман Г.Е.* Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищевая пром-сть. 1972, 368 с.

- Шульман Г.Е., Финенко Г.А., Аннинский Б.Е. и др. Биознергетика гидробионтов. Киев Наукова Думка 1990, 246 с.*
- Экологическая физиология рыб. Тез. докл. М. 1973. 276 с.*
- Экологическая физиология рыб. Тез. докл. Киев. Наукова Думка. 1976. 383 с.*
- Экологическая физиология и биохимия рыб. Тез. докл. Астрахань. 1979. 487 с.*
- Экологическая физиология и биохимия осетровых рыб. Ярославль. 1997. 153 с.*
- Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С. Эколого-биохимический мониторинг и эколого-биохимическое тестирование в районах экологического неблагополучия // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. 1, 74-83*
- Love R.M. The chemical biology of fishes. Academic Press. London. New York. 1970, 547 p.*
- Love R.M. The chemical biology of fishes. Academic Press. London. N.-Y. 1980, 943 p.*

МНОГОУРОВНЕВЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИЙ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ (НА ПРИМЕРЕ РЫБ)

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

Обсуждается трофическая, обменная, защитная, регуляторная и трансформационная функции пищеварительной системы рыб, а также значение полифункциональности и роль отдельных функций на уровне организмов, популяций и экосистем.

Известны три парадигмы физиологии питания — античная, классическая и современная (Уголев, 1985), которые отличаются как глубиной познания механизмов переработки пищи, так и различиями в оценке роли пищеварительной системы в функционировании отдельных организмов и их сообществ. Согласно античной парадигме, пища в пищеварительном тракте преобразуется в кровь и затем перераспределяется по всему организму. В основе классической парадигмы питания лежало представление о необходимости поддерживать при помощи питания молекулярный состав организмов. В рамках классической парадигмы были описаны важнейшие компоненты пищи и сформулирована теория сбалансированного питания. При этом анализировалась преимущественно трофическая функция пищеварительной системы. Формирование новой парадигмы питания, в значительной мере связанное с именем А.М. Уголева (1980, 1985), было обусловлено не только открытием мембранного пищеварения, вскрытием тонких механизмов внутриклеточного пищеварения и аутолиза, а также признанием важной роли микрофлоры в реализации пищеварительной функции, но и пересмотром теории сбалансированного питания. В результате ревизии традиционных представлений была предложена теория адекватного питания (Уголев, 1991), которая не только учитывает ранее неизвестные механизмы гидролиза и транспорта нутриентов, но и особенности эндозкологии организма-ассимилятора, а также важную роль пищеварения в поддержании биосферы (Уголев, 1985, 1991). В настоящее время не вызывает сомнения полифункциональность пищеварительной системы рыб (Кузьмина, 1997; Buddington et al., 1997). Опи-

саны трофическая, защитная, обменная, регуляторная и трансформационная функции пищеварительной системы и пищеварительных гидролаз рыб (Кузьмина, 1997).

Трофическая функция. Трофическая функция традиционно связывается с процессами экзотрофии. Для рыб, как и для высших позвоночных животных, описано пять взаимосвязанных типов пищеварения, обеспечивающих деполимеризацию объектов питания и перенос нутриентов к транспортным системам эпителия желудочно-кишечного тракта (Уголев, Кузьмина, 1993, Кузьмина, 1996). Три типа пищеварения (полостное, мембранное и внутриклеточное) осуществляются ферментными системами организма-ассимилятора, два других - симбионтное пищеварение и индуцированный аутолиз - ферментами микрофлоры и объектов питания. Несмотря на то, что темпы становления различных типов пищеварения у разных видов отличаются (Ильина, Турецкий, 1987, Кузьмина, Гельман, 1998), для всех рыб с прямым развитием характерны общие закономерности становления пищеварительной функции (рис. 1).

Для эффективной реализации трофической функции важно наличие в микробиальном сообществе видов, способных значительно трансформировать поток нутриентов, так как поглощая неусвояемые или неполноценные корма, некоторые микроорганизмы способны синтезировать аминокислоты, в том числе незаменимые, а также белки, липиды, витамины и другие соединения, создавая вторичный поток нутриентов, который может существенно корректировать недостатки кормовой базы рыб (Лубянская, 1989; Шивокен, 1989; Уголев, Кузьмина, 1993; Clements, 1997). Помимо процессов экзотрофии в реализации трофической функции участвуют процессы эндотрофии. Однако прежде необходимо охарактеризовать обменную функцию желудочно-кишечного тракта.

Обменная функция. Первые сведения о выделении в пищеварительный тракт важнейших компонентов внутренней среды, таких как белки, жиры и углеводы появились к началу 40-х годов (Разенков, 1948). Позднее были сформулированы представления об обменной функции пищеварительного тракта (Шлыгин, 1974), рециклингах различных веществ (Уголев, 1985), а также гомеостатировании гастро-энтеральной среды (Гальперин, Лазарев, 1986). В большом цикле работ,



Рис. 1. Схема становления трофической функции у рыб.

выполненных под руководством М. А. Щербины (1964-1980), было подтверждено выделение в пищеварительный тракт рыб различных компонентов внутренней среды (белки, жиры, углеводы, минеральные вещества) Их экскреция способствует обновлению состава различных тканей и органов, а также, возможно, обеспечивает гомеостатирование гастро-энтеральной среды рыб. Вместе с тем экскретируемые вещества наряду с экзогенными нутриентами могут вовлекаться в процессы пищеварения и транспорта. Следовательно, этот аспект деятельности пищеварительного тракта может рассматриваться как заключительное звено процессов эндотрофии. Сведения, касающиеся механизмов эндотрофии у рыб, фрагментарны. Однако не вызывает сомнения ключевая роль лизосомальных и других внутриклеточных гидролаз (Сорвачев, 1982; Немова, 1997). Процессы эндотрофии особенно важны для ви-

дов, прекращающих питаться при неблагоприятных условиях, а также в период длительных нерестовых миграций

Защитная функция. Известно, что у многих видов рыб отсутствуют лимфоидные узлы, реализующие специфическую иммунную защиту. При этом существует достаточно эффективная система неспецифической защиты от токсической и аллергической агрессии (Кузьмина, 1995). Структуры пищеварительного тракта всегда рассматривались как барьер между гастро-энтеральной и внутренней средой организма. Однако, в последние годы была выяснена уникальная роль щеточной каймы энтероцитов, функционирующей как молекулярное сито. Действительно, расстояние между микроворсинками апикальной мембраны энтероцитов составляет 1-2 мкм, размер ячеек гликокаликса - 10-20 нм, а эффективный радиус пор мембраны - 0,4-0,6 нм. Вследствие этого апикальную мембрану энтероцитов не способны преодолеть не только надмолекулярные агрегаты, но и молекулы с большой молекулярной массой, такие, как белки, входящие в состав пищи и являющиеся не только питательными веществами, но и мощными аллергенами (Уголев и др., 1992; Кузьмина, 1995).

При анализе особенностей энзиматического барьера у рыб было выделено 10 уровней, а также 8 источников ферментов (Кузьмина, 1995). В полости и пристеночном слое слизи доминируют ферменты, секретируемые желудочными железами и гепатопанкреасом, а также ферменты жертвы и микрофлоры. В небольшом количестве присутствуют солюбилизованные мембранные гидролазы. На структурах гликокаликса функционируют ферменты, имеющие то же происхождение. Начиная с апикальной мембраны энтероцитов, гидролиз осуществляется собственно кишечными ферментами, которые завершают мембранное и полностью осуществляют внутриклеточное переваривание белков. В случае сохранения белками своей структуры при транзите через эпителий, в действие вступают ферменты стромы слизистой и подслизистой оболочек, а также ферменты других постэпителиальных слоев. Если жертва захватывается целиком, то ее покровы и ферментные системы служат дополнительным структурным и энзиматическим барьером (Кузьмина, 1995).

Степень развития отдельных механизмов неспецифической защиты у разных видов рыб различна и, как правило, определяется ха-

рактором их питания. У хищников, не размельчающих жертву, высокая роль лизосомальных ферментов тканей объектов питания, участие которых в процессах аутодеградации в значительной мере компенсирует слабое развитие лимфоидной ткани у рыб.

Регуляторная функция. В регуляции процессов пищеварения участвуют различные гастро-интестинальные гормоны и пептиды, такие как гастрин, секретин, холецистокинин, глюкагон, гастро-ингибирующий пептид, вазоактивный интестинальный пептид, мотилин, церулеин (Уголев, 1978; Климов, 1983; Шпарковский, 1986; Уголев, Кузьмина, 1993). Помимо этого, в желудочно-кишечном тракте обнаружены кортикотропин, соматотропин, пролактин, бета-липотропин и эндорфины, которые ранее считались исключительно гипофизарными гормонами. В нервных волокнах и эндокринных клетках кишечника найдены тиролиберин, энкефалины, соматостатин, субстанция Р, нейротензин, бомбезин и люлиберин, а в мозге - гастрин, секретин, мотилин, глюкагон, инсулин и другие гормоны (Уголев, 1978; Климов, 1979; Гребенев и др., 1983). Эти факты свидетельствуют о наличии сложной системы энтеро-гипоталамических контуров регуляции процессов экзотрофии, включающих наряду с регуляцией процессов пищеварения, регуляцию аппетита (Уголев, 1978; Кассиль, 1990). Поскольку функциональное состояние "пищевого центра" рыб зависит не только от нейро-гормонального статуса, но и от уровня некоторых гуморальных агентов, в частности уровня глюкозы, аминокислот и цитрата натрия (Кузьмина, 1966), значительная часть которых поступает в кровь непосредственно из пищеварительного тракта, можно предположить, что снижение активности пищеварительных ферментов способно влиять на уровень метаболитов в крови, а следовательно, состояние "пищевого центра" и пищевое поведение рыб.

Трансформационная функция. В последние годы биосфера рассматривается, как трофосфера, функционирующая по принципу трофостата, функцию обратной связи в котором выполняют многочисленные гидролазы консументов, объектов питания и микрофлоры, обеспечивающие деструкцию органического вещества (Уголев, 1985). Если учесть величину кормовых коэффициентов у рыб, равных в южных районах России 5 - 6 (Фортулатова, Попова, 1973), а в центральных и северных 8- 12 (Иванова, 1966), то становится ясным, какое огромное

количество органического вещества трансформируется в пищеварительном тракте рыб. При этом разрушаются не только белки, жиры и углеводы - универсальные строительные и энергетические компоненты гетеротрофов, но и целлюлоза растений, и такие трудногидролизуемые компоненты тканей беспозвоночных животных, как воска и хитин (Уголев, Кузьмина, 1993). Подсчитано, что одна популяция бычка *Euphrus bison* в течение года способна разрушить до 16 т хитина и сделать доступным для рециклизации содержащийся в нем углерод, азот и другие элементы (Goodrich, Morita, 1977). Вместе с тем антропогенное загрязнение воды и особенно грунтов, может вызывать снижение активности ферментов пищеварительного тракта рыб и тем самым снижать эффективность трансформационной функции. Характер и степень влияния донных отложений зависит от вида рыб, состояния ферментных систем, типа и концентрации грунта (Кузьмина, 1992)

В связи с этим анализ трансформационной функции должен включать определение эффективности функционирования ферментных систем трофических партнеров в условиях реальной окружающей среды, с учетом численности рыб и биомассы объектов питания, потребляемых отдельными популяциями и ихтиоценозами. Несмотря на важность трансформационной функции пищеварительных гидролаз, количественная оценка ее роли в различных экосистемах в настоящее время затруднена из-за ряда методических трудностей и в значительной мере является задачей будущего.

Значение полифункциональности пищеварительной системы для разных уровней организации экосистем. Полифункциональность пищеварительной системы рыб, включающая трофическую, обменную, защитную, регуляторную и трансформационную функции, базируются на полифункциональности составляющих ее элементов — тканевых и клеточных структур, различных макромолекул и их агрегаций, в частности, ферментных систем консументов, микрофлоры и объектов питания. Помимо указанных выше базовых существуют не менее важные функции, реализующиеся этими и другими элементами (рециклинг различных метаболитов, гомеостатирование гастро-энтеральной среды, регуляция непищеварительных функций, участие в адаптациях рыб к условиям жизнедеятельности и другие). Полифункциональность пищеварительной системы наиболее полно охарактеризована для организ-

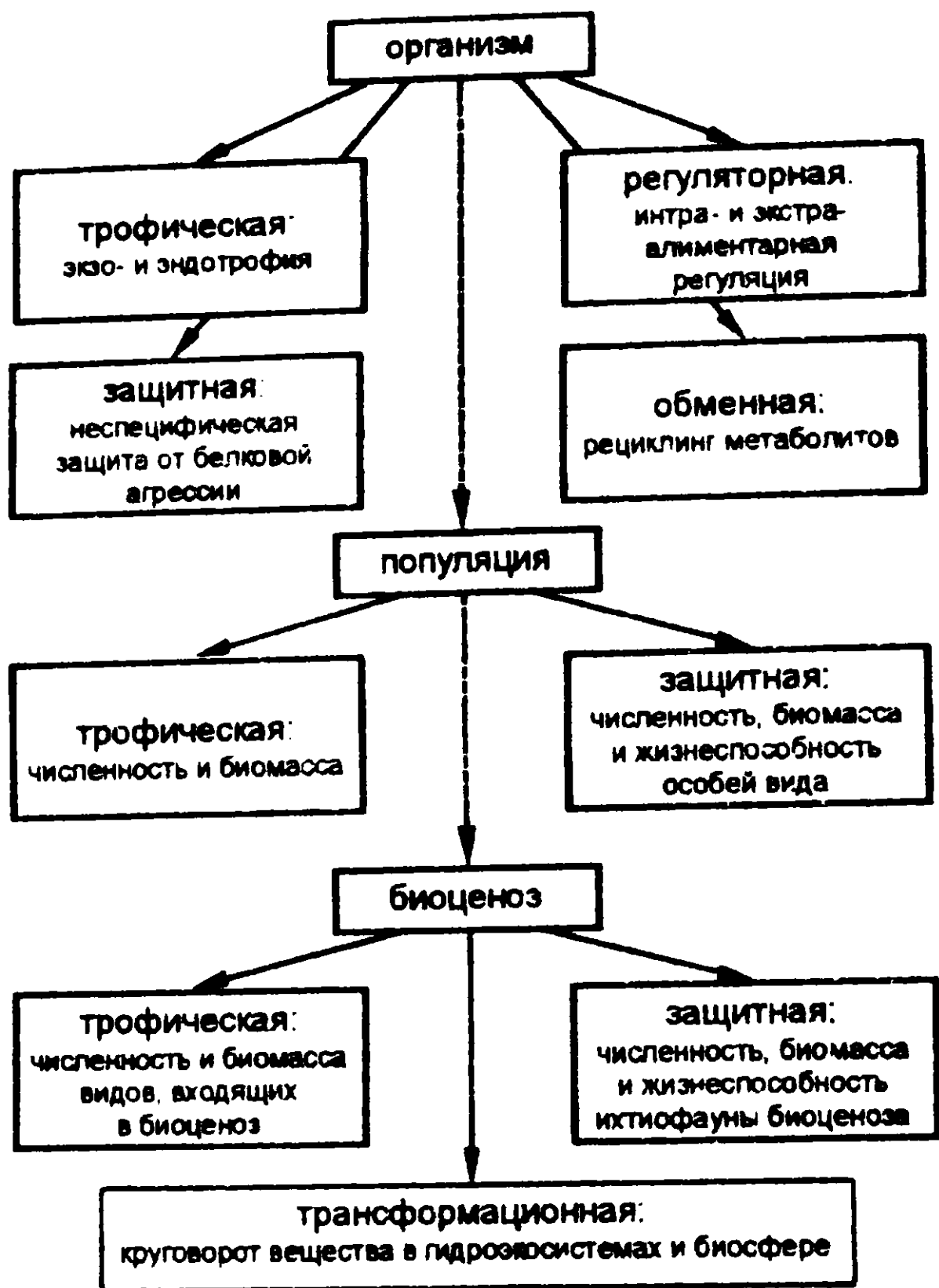


Рис. 2. Схема функций пищеварительной системы рыб на организменном, популяционном и биоценоотическом уровнях.

менного уровня (рис. 2).

Изменения характеристик ферментов, реализующих процессы экзо- и эндотрофии, а также характеристик транспортных систем пищеварительного тракта рыб, как правило, являются адаптивными. Адаптации ферментов к условиям функционирования наблюдаются и на уровнях, более высоких, чем организменный - популяционном и биоценоотическом. Действительно, изучение в идентичных методических условиях активности пищеварительных гидролаз у рыб, относя-

щихся по типу питания к разным экологическим группам и у их объектов питания показало, что кормовые объекты могут вносить существенный вклад в пул гидролаз, деструктурирующих высокомолекулярные компоненты их собственных тканей. Наибольшая активность протеаз и наименьшая активность карбогидраз характерна для видов, которыми питаются хищники, в то время как максимальная активность карбогидраз и минимальная активность протеаз - для бентических форм, особенно моллюсков (Уголев, Кузьмина, 1993). Эта закономерность отмечена и при исследовании кишечной микрофлоры у рыб разных видов (Лубянскене и др., 1989). На примере лагодрона, *Lagodon rhomboides* показано, что при увеличении в рационе рыб растительной пищи наблюдается увеличение количества карбоксиметилцеллюлолитических бактерий на фоне неизменного количества протеолитических бактерий (Luczkowich, Stelwag, 1993). Адаптивные перестройки ферментных систем, реализующих трофическую функцию на биоценотическом уровне, иерархически включают все известные в настоящее время типы и механизмы биохимических, физиологических и поведенческих адаптаций (Кузьмина, 1996). Эффективность защитной функции, реализуемой многоуровневой системой неспецифической механической и энзиматической защиты, также в значительной мере зависит от адаптированности пищеварительных гидролаз. Это же в равной мере относится и к регуляторной функции, обеспечивающейся взаимодействием нервной и гуморальной составляющих, и в определенной степени связанной с процессами саморегуляции (на уровне взаимодействия ферментов с различными компонентами содержимого желудочно-кишечного тракта). Для обменной и гомеостатирующей функций, равно как рециклингов различных веществ и процессов эндотрофии чрезвычайно важны адаптации не только белковых, но и липидных компонентов мембран эпителиоцитов (Уголев, Кузьмина, 1993).

Более высокие уровни организации иерархически включают все функции, характерные для организменного уровня. При этом для популяционного уровня наибольшее значение имеют трофическая и защитная функции, поскольку первая в значительной мере определяет биомассу особей, вторая - устойчивость к болезням и численность составляющих популяцию особей. Для популяций тиличных и факультативных хищников, помимо указанных, большое значение имеет транс-

формационная функция, так как часть популяции может уничтожаться входящими в нее особями. Для биоценотического уровня наиболее важны трофическая функция (взаимодействие трофических партнеров и влияние состояния пищеварительной системы рыб на степень выедания кормовой базы), защитная функция, влияющая на численность видов, входящих в ихтиоценозы и трансформационная, обеспечивающая благодаря активности пищеварительных гидролаз трофических партнеров и симбионтов круговорот вещества в водных экосистемах и биосфере в целом.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ N 98-04-49099.

ЛИТЕРАТУРА

- Гальперин Ю.М., Лазарев П.И. Пищеварение и гомеостаз. М.: Наука, 1986. 306 с.
- Гребнев А.Л., Цодиков Г.В., Кочина Е.Н., Виноградов В.А., Герман С.В., Гребнева Л.С., Положенкова Л.А., Цветкова Л.И. Нейрогуморальная регуляция пищеварения. М.: Медицина. АМН СССР. 1983, 288 с.
- Иванова М.Н. Питание и пищевые взаимоотношения хищных рыб в Рыбинском, Горьковском и Куйбышевском водохранилищах // Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИЭМЭЖ. 1966, 17 с.
- Ильина И.Д., Турецкий В.И. Развитие пищеварительной функции у рыб // Вопр. ихтиол., 1987. 27, 835-843.
- Кассиль В.Г. Пищевое поведение в онтогенезе. Л.: Наука. 1990, 220 с.
- Климов П.К. Пептиды и пищеварительная система. Л.: Наука. 1983, 272 с.
- Кузьмина В.В. Влияние гуморальных факторов на скорость пищевой реакции рыб // Докл. АН СССР. 1966. 170, 486-488.
- Кузьмина В.В. Влияние грунта на начальные этапы ассимиляции пищи у русского осетра и стерляди // Докл. АН. 1992. 326, 749-762.
- Кузьмина В.В. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопр. ихтиол. 1995. 35, 86-93.
- Кузьмина В.В. Трофология рыб (физиолого-биохимические аспекты) // Биология внутренних вод. 1996, 1 14-23.
- Кузьмина В.В. Трофическая, защитная и трансформационная функция пищеварительной системы рыб // Первый конгресс ихтиологов России. М.: ВНИРО. 1997, 225-226.
- Кузьмина В.В., Гельман А.Г. Особенности становления пищеварительной функции рыб // Вопр. ихтиол. 1998. 38, 113-122.

- Дабянскене В.Н., Бербицкас Ю., Янкавичус К.К., Лясаускаене Т., Грибаускаене В., Тряпшене О., Юзоленене Ю., Ястюгенене Р., Дабянская М., Янкаускаене Р. Обязательный симбиоз микрофлоры пищеварительного тракта и организма Вильнюс: Мокслас. 1989. 191 с.
- Немова Н.Н. Внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб. Петрозаводск. КНЦ РАН, 1997. 104 с.
- Разенков И.П. Новые данные по физиологии и патологии пищеварения. М.: Медгиз. 1948. 288 с.
- Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб (эколого-биохимические аспекты). М.: Легкая и пищевая пром-сть. 1982. 247 с.
- Уголев А.М. Энтериновая (кишечная гормональная) система. Л.: Наука. 1978. 315 с.
- Уголев А.М. Трофология – новая междисциплинарная наука // Вестн. АН СССР. 1980. 1, 50-61.
- Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 1985. 544 с.
- Уголев А.М. Теория адекватного питания и тофология. СПб.: Наука. 1991. 272 с.
- Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М. Энзиматический барьер тонкой кишки // Физиол. журн. 1992. 78, 1-20.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат. 1993. 238 с.
- Шивокене Я.С. Симбиотное пищеварение у гидробионтов и насекомых. Вильнюс: Мокслас. 1989. 223 с.
- Шлыгин Г.К. Участие желудочно-кишечного тракта в общем обмене веществ // Руководство по физиологии: физиология пищеварения. Л.: Наука. 1974. 571-587.
- Шпарковский И.А. Физиология пищеварения рыб: двигательная функция. Л.: Наука. 1986. 176 с.
- Щербина М.А. Определение перевариваемости искусственных кормов у прудовых рыб при помощи инертного вещества // Вопр. ихтиол. 1964. 4, 672-678.
- Щербина М.А. Физиологические закономерности пищеварения у рыб в связи с морфологическими особенностями пищеварительного тракта и экологическими условиями (на примере *Cyprinus carpio* L. и *Salmo trideus* Gibb.) // Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: ИЭМЭЖ. 1980. 52 с.
- Фортулатова К.Р., Попова О.А. Питание и пищевые взаимоотношения хищных рыб в дельте Волги. М.: Наука. 1973. 299 с.
- Buddington R.K., Kroghdahl A., Bakke-McKeller A.M. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet // Acta

Physiol. Scand. 1997. 161, 67-80.

Clements K. D. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes //Gastrointestinal ecosystems and fermentations (eds R I Mackie and B.A. White). N Y.: Chapman and Hall, 1997. 6, 156-198.

Coodrich T.D., Morita R.Y. Incidence and estimation of chitinase activity-associated with marine fish and other estuarine samples // Marine Biol. 1977. 41, 349-353.

Luczkowich J.J. , Stelwag E.J. Isolation of cellulolytic microbes from the intestinal tract of the pinfish. *Lagadron rhomboides*: size-related changes in diet and microbial abundance // Marine Biol. 1993. 116, 381-386.

HEMOBA

**НЕМОВА Н.Н., КЯЙВЯРЯЙНЕН Е.И., КРУПНОВА М.Ю.,
БОНДАРЕВА Л.А.**

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ В ЭКОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЯХ У ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Известно, что адаптации к условиям окружающей среды как универсальное общебиологическое явление, формируются и проявляются на различных уровнях организации живого - от молекулярного до биоценотического (Хочачка, Сомеро, 1988). Регуляция на биохимическом уровне, которую можно обнаружить лишь косвенным путем, способна устранить необходимость различий на более высоких уровнях. Если условия среды изменяются или организм переходит на новую стадию развития, возникают дополнительные метаболические задачи, для решения которых могут понадобиться количественные и качественные преобразования ферментных систем, изучение которых в биохимических механизмах клеточной адаптации является одним из важных аспектов фундаментальной проблемы биохимической адаптации животных. Среди множества механизмов регуляции клеточного метаболизма важное место занимает протеолиз, являющийся прерогативой выживания клеток, тканей, организмов (Bohley, 1987). Протеиназы действуют на первом, ключевом этапе мобилизации белковых резервов клетки и поэтому их роль в механизмах биохимических адаптаций невозможно переоценить. Регуляторная роль этих ферментов связана с участием в реакциях ограниченного протеолиза как инструмента включения или переключения определенных звеньев обмена и некоторых физиологических процессов (Локшина, 1979). Внутриклеточный протеолиз включает два основных пути - лизосомальный и нелизосомальный и осуществляется при участии целой системы протеиназ и пептидаз. Лизосомальная система играет основную роль в эндогенном протеолизе, так как способна поглощать и утилизировать клеточный материал путем аутофагии и обладает огромной протеолитической способностью. Изменения функций лизосом относятся к ранним адаптационным реакциям организма на изолированное и сочетанное действие экстремаль-

ных факторов. Помимо участия протеиназ в процессах, связанных с так называемой срочной адаптацией к изменяющимся факторам среды, возможно повышение активности внутриклеточных протеиназ (и других лизосомальных гидролаз), приводящее к образованию биологически активных веществ, которые в последующем влияют на синтез нуклеиновых кислот и белка. Таким образом индуцируются структурные перестройки, характерные для долговременной адаптации, что является проявлением неспецифического адаптационного синдрома клетки.

Такого рода исследования проводились нами на различных биологических объектах, но в основном, на рыбах - обитателях внутренних водоемов. Были изучены рост и созревание половых клеток, оплодотворение, эмбриональное и постэмбриональное развитие, сезонность, голодание, температурный и кислородный режимы, загрязненность водоемов веществами различной природы, действие токсических факторов и их смесей в естественных условиях и в аквариальных экспериментах.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали представителей сем. Salmonidae, Acipenseridae, Cyprinidae, Percidae. Материалом служили разные органы рыб, а также их икра и ранние личинки на различных этапах жизненного цикла. Развитие икры проходило в условиях рыбоводных заводов. Проведение ихтиологических и токсикологических экспериментов осуществлялось при помощи сотрудников СеврыбНИИпроекта (Петрозаводск), ВНИИПРХа (п. Рыбное Московской обл.), ПИНРО (Мурманск), ИБВВ (п. Борок Ярославской обл.).

Гомогенизирование тканей, дифференциальное центрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, гель-хроматографию, ионообменную хроматографию проводили общепринятыми методами. Определение содержания белка и активности протеолитических ферментов (лизосомальных катепсинов В и D, эластазы, кальций-активируемых протеиназ цитозоля) описано в опубликованных ранее работах (Немова, 1987; Немова, Сидоров, 1984; Немова и др., 1980, 1990, 1993, 1994, 1996).

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в ходе многолетних исследований, свидетельствуют о том, что адаптивная роль внутриклеточных протеиназ определяется как эколого-физиологическим значением лизосом в ответе организма на действие разнообразных факторов среды, так и регуляторной функцией протеиназ, особенно кальцийактивируемых. Система протеолитических ферментов оказывается весьма чувствительной при различных физиологических и патологических изменениях в организме рыб в процессе его жизнедеятельности. Показана четкая корреляция между содержанием белка, активностью катепсинов и кальпайнов и стадиями полового цикла или стадиями эмбриогенеза у всех исследованных видов рыб (Немова, Сидоров, 1980а, 1984, 1990б; Немова и др., 1980, 1992, 1993). Присутствие протеиназ в яйцеклетке предполагает их участие в производстве запасного желтка, а также в структурных изменениях цитоплазмы. Обнаружены некоторые различия в характере изменения исследуемых биохимических параметров между видами рыб, различающимися по экологии (Немова, 1991). Стадиоспецифичность изменения активности вышеуказанных протеиназ связана скорее всего с эволюционными биохимическими адаптациями. Кроме того, следует отметить, что характер изменения активности лизосомальных и кальцийактивируемых протеиназ цитозоля в эмбриогенезе исследуемых рыб обнаруживает определенное сходство, а распределение активности протеиназ в зародышах между фракциями желтка и зародыша отражает функциональные различия ферментов. Отмеченные различия во временной индукции активности катепсинов можно также объяснить их индивидуальной регуляцией в онтогенезе, что было показано ранее для млекопитающих (Messina et al., 1980).

Экологические, в том числе токсикологические факторы влияют на интенсивность функций ферментов (ингибирующий или активирующий эффект, изменение структурной локализации фермента, либо сдвиг проявления ответной реакции на той или иной критической стадии развития) (Немова и др., 1994). Реактивность системы протеолиза при различных воздействиях находится в зависимости от типа фактора, его концентрации, физиологического состояния или этапа развития организма. В данном случае лизосомы, по-видимому, играют

роль не только в развитии повреждений, но и в адаптационной перестройке белкового метаболизма клетки. Об этом свидетельствуют многочисленные результаты по изучению внутриклеточных протеиназ у рыб при действии различного рода токсикантов и их смесей, а также при патологиях, вызванных бактериальными и вирусными инфекциями (Немова, 1987; Немова, Сидоров, 1990а; Немова и др., 1992, 1994а, б, 1996). Например, при изучении так называемого «расслоения» мышц у осетровых было показано (Немова и др., 1992), что в мускулатуре больных рыб наблюдается преимущественная активация кальпаинов, особенно кальпаина II, ответственного за протеолитическую деградацию Z-дисков (Dayton et al., 1976). Значительное возрастание активности лизосомальных протеиназ и эластазы в тканях рыб из водоемов, загрязненных стоками горнообогатительного производства, указывает на реализацию защитной функции лизосом и усиление аутофагоцитоза, а достоверное снижение активности кальпаинов в мышечной ткани тех же рыб свидетельствует о снижении необратимых метаболических реакций, а, соответственно, и функций в клетке, в регуляции которых принимают участие кальцийактивируемые протеиназы (Немова и др., 1996). Ингибирующий эффект солей тяжелых металлов на цистеинзависимые протеиназы (кальпаины, катепсин В) тканей рыб продемонстрирован при изучении эмбрионального развития сигов в условиях аквариального эксперимента (Немова и др., 1983). Следует заметить, что если воздействующий фактор достигает пороговых значений, то адаптивные возможности организма (в том числе и на субклеточном уровне) резко снижаются. Это подтверждается и данными по изменению активности внутриклеточных протеиназ и субклеточной локализации лизосомальных катепсинов. Кроме того, угнетение активности катепсинов В и D может препятствовать формированию ферментного состава лизосом, так как ряд вновь синтезированных лизосомальных гидролаз, попадая в лизосомы, проявляет активность лишь после ограниченного протеолиза вышеназванными катепсинами.

Высокая и адекватная действующим факторам реактивность систем внутриклеточного протеолиза говорит в пользу ее важного значения как одного из инструментов биохимической адаптации клеток, направленной на перестройку метаболизма и обновление клеточных структур в ответ на изменение условий внешней среды Трансформи-

руя или отвечая на внешний сигнал запуском внутриклеточных каскадов реакций, протеиназы участвуют в осуществлении направленных изменений функций клеток, связанных с качественными изменениями обмена. Эти процессы могут лежать в основе клеточной дифференцировки и трансформации клеток, адаптационной перестройки обмена (Дин, 1981; Локшина, 1979). Естественно, что такие сложные биологические процессы не могут быть реализованы с помощью только одного регуляторного механизма. Они осуществляются при координированном действии различных регуляторных систем, и протеиназы могут служить одним из индукторных или регуляторных механизмов.

Отмеченные различия в характере изменения активности внутриклеточных протеиназ в развитии рыб и в различных эколого-физиологических ситуациях могут служить одним из дополнительных биохимических тестов эколого-биохимического мониторинга, возможности которого в настоящее время активно обсуждаются при решении различных практических задач.

Следует подчеркнуть, что внутриклеточные протеолитические ферменты у рыб обнаруживают значительное сходство с таковыми у млекопитающих по многим параметрам, что подтверждает тот факт, что процесс протеолиза имел место уже на самых ранних этапах химической эволюции и имеет сходные механизмы у видов, различающихся длительностью своей истории (Антонов, 1983; Степанов, 1997). Те небольшие отличия в характере изменения активности протеиназ и в соотношении их типов, различающихся по субстратной специфичности, которые характерны для рыб и других гидробионтов, связаны прежде всего с условиями их существования, длительностью жизненных циклов, температурными условиями. Поэтому, изучение и оценка роли внутриклеточного протеолиза в процессах биохимических адаптаций у рыб может иметь также значение для понимания механизмов адаптаций у других классов животных.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 98-04-48482

ЛИТЕРАТУРА

- Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука. 1983, 367 с.
- Дин Р. Процессы распада в клетке. М.: Мир. 1981, 120 с.
- Локшина Л.А. Регуляторная роль протеолитических ферментов // Молек. биол. 1979. 13, 1205-1229.
- Немова Н.Н. Влияние некоторых неблагоприятных факторов зимовки на активность лизосомальных протеиназ тканей карпа // Биохимия молодежи рыб в зимовальный период. Петрозаводск, 1987, 99-101.
- Немова Н.Н. Свойства и физиологическая роль внутриклеточных протеиназ в тканях рыб // Успехи совр. биол. 1991. 111, 948-954.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Внутриклеточное распределение и активность катепсинов В и D в яйцах сига до и после оплодотворения // Онтогенез. 1980а, 11, 85-87.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Лизосомальные протеиназы в эмбриогенезе лосося *Salmo salar* L. // Журн. эволюц. биохим. физиол. 1984. 20, 576-580.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Влияние некоторых токсикологических факторов на лизосомальные протеиназы пресноводных рыб // Гидробиол. журн. 1990а. 26, 69-73.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С. Динамика активности катепсина D в гонадах самок рыб при созревании // Вопр. ихтиол. 1990б. 30, 516-519.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С., Рипатти П.О. Лизосомальное переваривание белков органов лосося *Salmo salar* L. При голодании в условиях содержания в садках в преднерестовый период // Вопр. ихтиол. 1980. 120, 180-182.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С., Григорьева Л.И., Валуева Т.А., Мосолов В.В., Кяйваряйнен Е.И., Лукьяненко В.И. Внутриклеточные протеиназы в органах русского осетра *Acipenser guldenstaedti* при расслоении мышц // Вопр. ихтиол. 1992. 32, 57-62.
- Немова Н.Н., Кяйваряйнен Е.И., Мосолов В.В., Вадуева Т.А., Григорьева Л.И., Сидоров В.С. Кальцийактивируемая протеиназа в эмбриогенезе лосося *Salmo salar* L. // Журн. эвол. биохим. физиол. 1993 № 3, 231-235.
- Немова Н.Н., Крупнова И.Ю., Кяйваряйнен Е.И., Волков И.В. Влияние токсических факторов на протеолитическую активность в икре и ранних личинках рыб // Известия РАН. Сер.биол. 1994а. № 4, 528-534.
- Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Активность протеиназ лизосом в тканях карпа при аэромонозе // Журн. прикл. биохим. микробиол. 1994б. 30, 454-457.
- Немова Н.Н., Кяйваряйнен Е.И., Крупнова М.Ю. Влияние промстоков на ак-

тивность внутриклеточных протеиназ некоторых пресноводных рыб // Вопр ихтиол. 1996 36, 420-422

Степанов В.М. Эволюция протеиназ. Аналогии и параллели // Тез. докл IV всесоюз симп. «Химия протеолитических ферментов». М., 1997 С 5

Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М., 1988. 568 с.

Bohley R. Intracellular proteolysis // Hydrolytic enzymes Biomedical division. N.Y., 1987, 307-332.

Dayton W.R., Revill W.J., Goll D.E., Stromer M.H. A Ca-activated protease possibly involved in miofibrillar protein turnover Partial characterization of purified enzyme // Biochemistry. 1976. 15, 2159-2167

Messina M., Tessitore L., Musi M., Baccino F.M., FiszerSzaffar, Nadal B Lyso-somal hydrolases activities in the developing rat liver // Bull. Soc. Ital. Biol. Sper. 1980. 56, 57-69.

ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЛИЗОСОМ У РЫБ ПРИ ГОЛОДАНИИ

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Важнейшим фактором среды, играющим первостепенную роль в биохимической, морфологической и экологической адаптации видов, является пища. С другой стороны, такие основные функции организма как питание, дыхание и размножение взаимосвязаны и взаимообусловлены и находятся под регулирующим влиянием нервной и эндокринной систем. Поэтому изучение механизмов поддержания гомеостаза, обеспечения организма необходимыми энергетическими и пластическими веществами на разных стадиях онтогенеза, при различных физиологических состояниях представляет несомненный интерес как для фундаментальной науки, так и для решения практических задач сельского хозяйства и рыбоводства.

При несбалансированном питании (белковая недостаточность, избыточное поступление липидов и углеводов), частичном и полном голодании включаются различные механизмы физиолого-биохимической адаптации, регулирующие интенсивность и направленность метаболизма на тканевом и клеточном уровнях (Покровский, 1974). Большой интерес представляет изучение этих механизмов у рыб – уникальной по видовому многообразию, характеру питания и условиям обитания группы позвоночных животных.

Большинство показателей метаболизма у рыб, как и у других животных, характеризуется изменчивостью в соответствии с сезонными физиологическими ритмами, обусловленными влиянием эндогенных и экзогенных факторов, что показано в работах Г.Е.Шульмана (1972), И.А.Баранниковой (1975), М.И.Шатуновского (1980), В.С.Сидорова (1983) и др. Выявлена определенная специфика физиолого-биохимических характеристик годовых циклов рыб в зависимости от видовых особенностей, стадии онтогенеза, принадлежности к той или иной экологической группе.

Рыбы, в отличие от большинства высших позвоночных, обладают феноменальной способностью в определенные периоды годового цикла обходиться без экзогенного поступающей пищи, сохраняя при этом высокую активность (Коржуев, 1979). Многие стороны пищевых

адаптивных перестроек, в том числе ферментных систем, участвующих в полостном и мембранном пищеварении у видов с различной экологией, довольно хорошо изучены и охарактеризованы в работах А.М. Уголева (1993) и В.В. Кузьминой (1994). Меньше сведений о роли ферментных систем лизосом, осуществляющих внутриклеточное пищеварение у голодающих рыб.

В настоящей работе представлены данные по сравнительному изучению активности лизосомальных ферментов у лосося (*Salmo salar* L.), радужной форели (*Salmo gairdneri* R.), карпа (*Cyprinus carpio* L.) и леща (*Abramis brama* L.) при различных типах голодания (нерестовые миграции, зимовка, вынужденное голодание).

Нами было показано, что одним из проявлений адаптаций на уровне клетки у рыб, как и у других видов, является значительная активация ферментов лизосом и нарушение стабильности их мембран. Сравнительное изучение этих механизмов у высших и низших позвоночных выявило, что у птиц (кур) и млекопитающих (крыс, кроликов, норок), не приспособленных к длительному голоданию, активация лизосомальных ферментов происходит быстрее и на большую величину, чем у рыб (Васильев, Звягина, 1978; Высоцкая и др., 1989). У последних наблюдается растянутость данных процессов во времени. Выявлены определенные отличия в лизосомальной реакции на голодание у рыб при разных формах голодания. В экспериментах на радужной форели показано, что при вынужденном полном голодании в течение одного месяца активность всех лизосомальных гидролаз в печени значительно возрастала по сравнению с контролем. Такая же картина наблюдалась в почках и селезенке, исключая ДНКазу, активность которой в селезенке несколько снижалась. В жабрах, как и в других органах, отмечен очень высокий уровень β -глюкозидазы. В мышцах активность изученных гидролаз была значительно ниже контроля.

С увеличением продолжительности голодания до двух месяцев у форели наблюдались разнонаправленные изменения активности ферментов. При более низком уровне кислой фосфатазы, ДНКазы и РНКазы, почти во всех органах сохранялся довольно высокий уровень β -глюкозидазы в жабрах и селезенке, а также в мышцах. Протеолитическая активность во всех органах (кроме селезенки) была выше, чем в контроле (Крупнова и др., 1985). Следовательно, не все лизосомальные гидролазы одинаково реагируют на голодание. Кроме того, показана зависимость характера изменения их активности от сезона

дужная форель наиболее тяжело переносит голодание летом.

Таким образом, при вынужденном голодании приспособительные реакции со стороны лизосомального аппарата разных органов проявляются в неравномерном повышении активности отдельных ферментов на ранних сроках голодания, затем активность большинства ферментов начинает снижаться. Как правило, на более поздних сроках голодания возрастает активность кислых гидролаз в скелетной мускулатуре. Так, у карася, голодавшего более года, в мышцах наряду с резким обводнением тканей, снижением содержания белка (до 40-50% от контрольного уровня) наблюдалось значительное, в 1,5-2,5 раза, повышение удельной активности кислой фосфатазы, β -глюкозидазы, РНКазы и ДНКазы (Высоцкая и др., 1989).

При генетически закрепленном голодании (нерестовые миграции лососевых, зимовка карпа и леща) также отмечено своеобразное изменение биохимических показателей в зависимости от вида, физиологического состояния и других особенностей. У атлантического лосося во время нерестовой миграции за счет эндогенного питания происходит обеспечение организма энергией на движение и одновременно усиливаются процессы катаболизма, направленные на перераспределение запасного и структурного материала (белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов) для образования генеративных продуктов. В этот период почти во всех тканях лососей резко возрастает активность лизосомальных нуклеаз, гликозидаз, кислой фосфатазы и катепсина D (рис. 1); в то же время, как показано Н. Н. Немовой с соавт. (1980), значительно снижается содержание белка в мышцах.

Активация лизосомального аппарата в тканях сеголетков карпа отмечена в начале зимовального периода, на протяжении которого наблюдались максимумы активности отдельных ферментов на разных сроках зимовки (рис. 2). То же самое можно сказать и о проявлении минимальной активности лизосомальных гидролаз в ходе зимовки молоди карпа. Так, для катепсина D – это февраль, для кислой фосфатазы и нуклеаз – март, а для β -глюкозидазы – май. Эти данные можно рассценивать как доказательство существования самостоятельных путей регуляции синтеза каждого фермента.

У лещей к концу зимовки отмечен более высокий уровень лизосомальных ферментов в селезенке, печени и жабрах по сравнению с предзимовым периодом (рис. 3). В мышцах к этому времени сохраняется высокая активность нуклеаз, но достоверно снижена активность

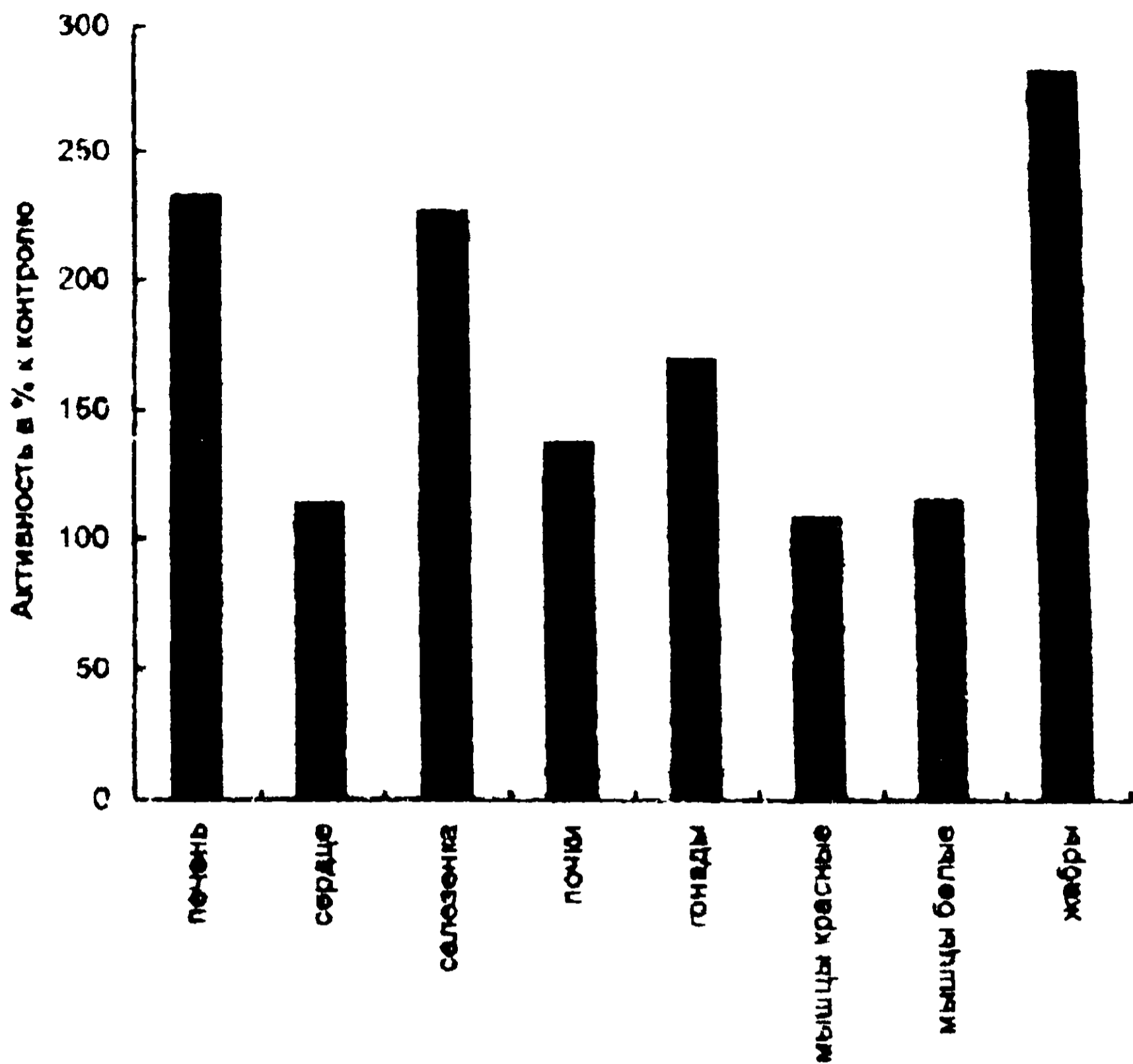


Рис. 1 Активность кислой ДНКазы в разных органах самок лосося *Salmo salar* в период преднерестового созревания гонад (контроль - II-III стадия зрелости гонад)

кислой фосфатазы и β -глюкозидазы. В целом судя по амплитуде изменений активности изученных ферментов метаболизм карпа и леща, обеспечиваемый во время зимовки главным образом активной работой ферментативных систем, носит поддерживающий характер.

Следует отметить, что, несмотря на выявленные отличия, в реакции внутриклеточных ферментных систем на выключение экзогенного питания много сходства, так как любая форма голодания рассматривается как состояние длительного стресса (Покровский, 1974) и рыбы в этом смысле не являются исключением. Известно, что при

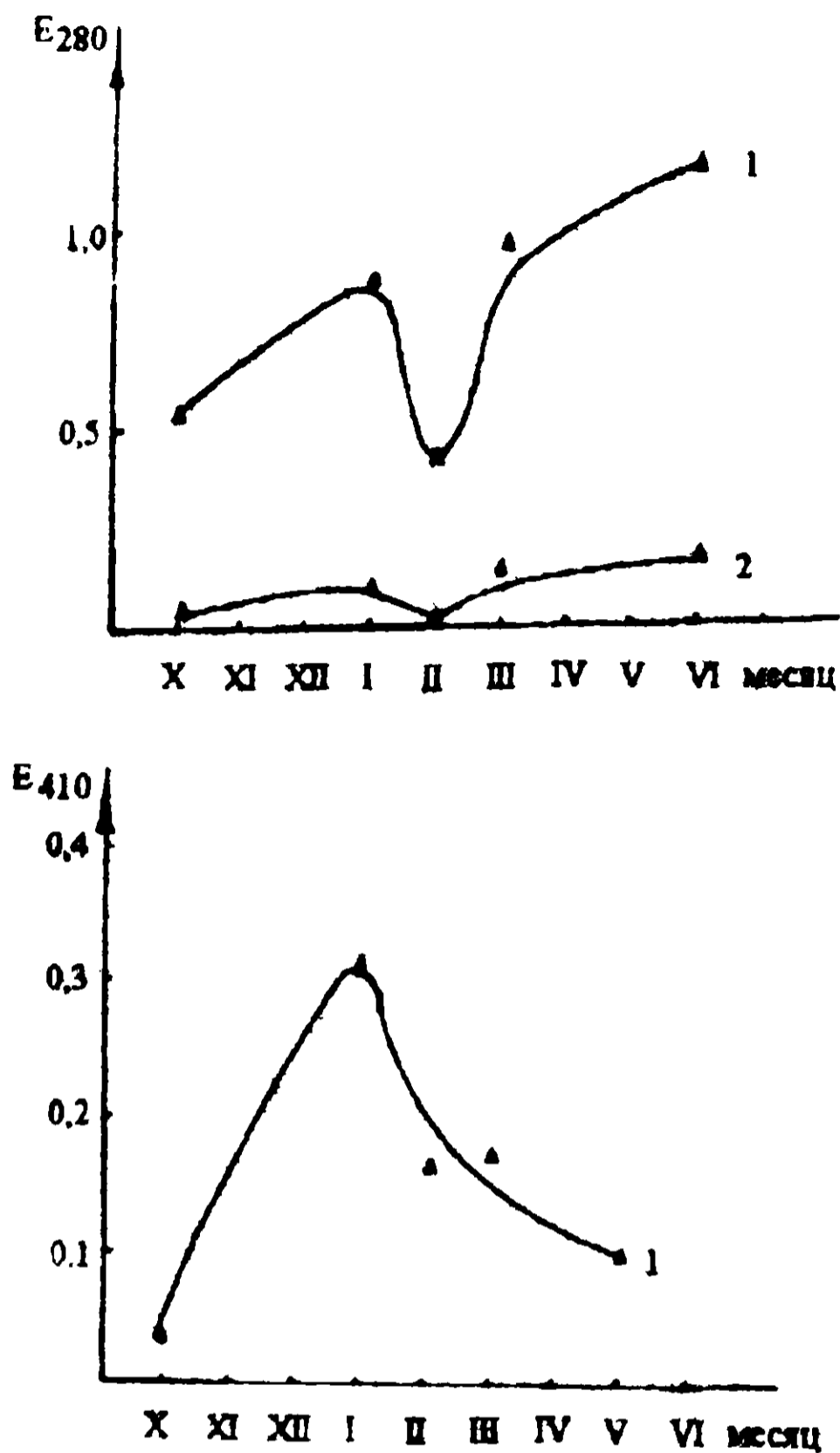


Рис. 2. Изменение активности катепсина D (вверху) и β -глюкозидазы (внизу) в печени (1) и мышцах (2) сеголетков карпа в период зимнего голодания.

стрессе, в том числе вызванном голоданием, в крови рыб происходит увеличение концентрации катехоламинов (Mazeaud et al., 1977) и гормонов, запускающих катаболические реакции.

Выявлены различия как в расходовании вещества, так и в степени активации лизосомальных ферментов в разных органах рыб в зависимости от стадии онтогенеза и биологических особенностей вида. Они определяются стадийностью адаптивных перестроек метаболизма при переключении на эндогенное питание, а также спецификой функций, выполняемых органами и тканями. Известно, что на начальных сроках голодания происходит довольно быстрое расходование запасов гликогена для стабильной работы таких жизненно важных органов, как

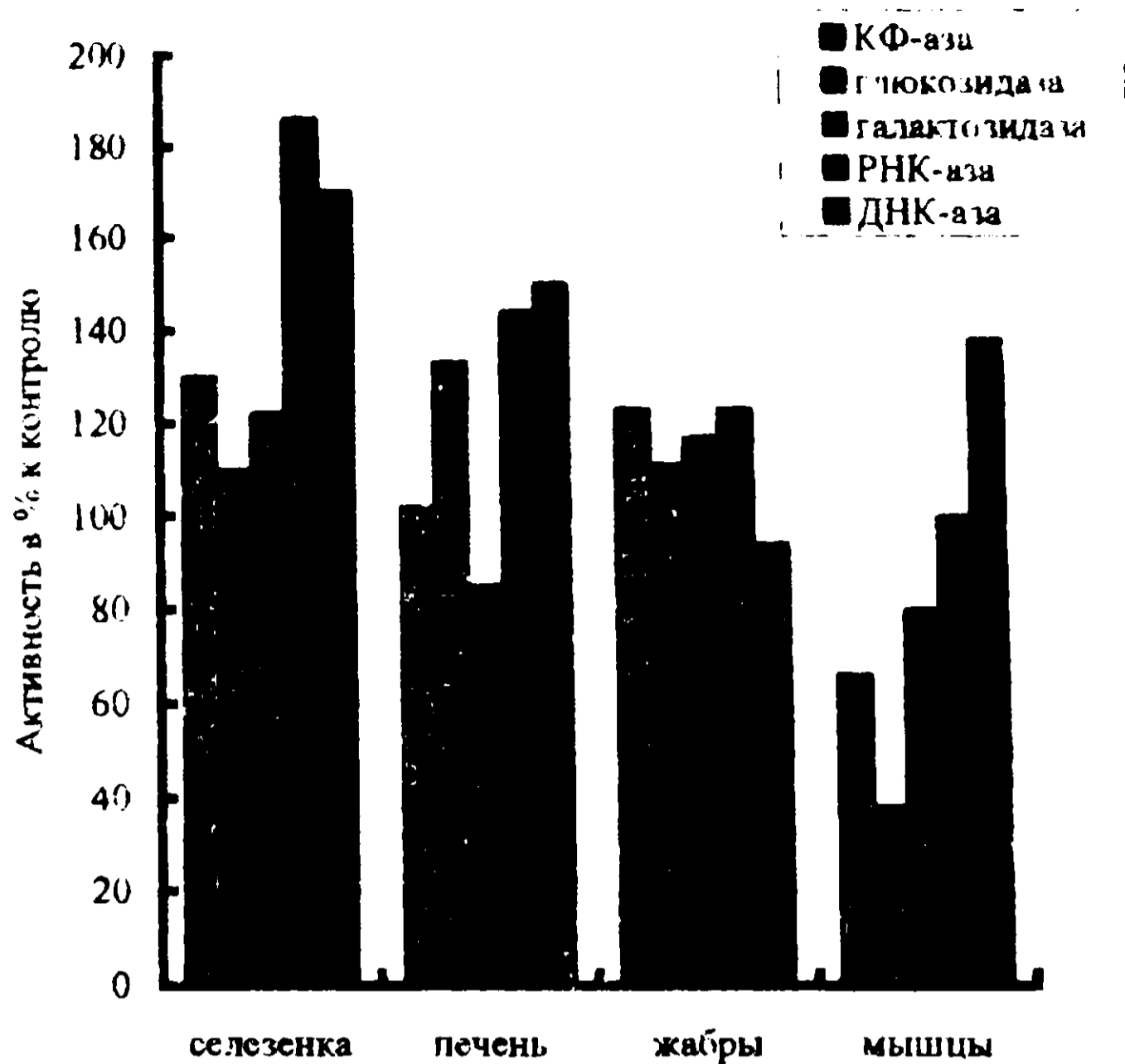


Рис. 3. Изменение активности ферментов в разных органах леща за время зимовки, в % к предзимовальному периоду.

головной мозг и сердце. На второй стадии происходит переключение метаболизма на расщепление липидов, при этом активируются ферменты, окисляющие жирные кислоты и, наконец, на третьей стадии, характеризующейся полным истощением энергетических ресурсов, резко усиливается катаболизм белков, использующихся как источник энергии (Сорвачев, 1982; Black, Love, 1986)

В наших экспериментах общая активность кислой фосфатазы в разных органах радужной форели возрастала пропорционально сроку голодания (19, 28, 49 дней), исключение составлял головной мозг (Руоколайнен, 1985). У лещей за время зимовки запасы гликогена в значительной степени уже истощены, израсходованы также запасы липидов, что показано в исследованиях, проведенных в нашей лаборатории (Загорских, Сидоров, 1989). По данным, представленным на рис. 4, можно заключить, что при выходе из зимовки также значительно снижено содержание белка в селезенке, жабрах и мышцах. Меньшее расходование белка в печени леща по сравнению с другими органами свя-

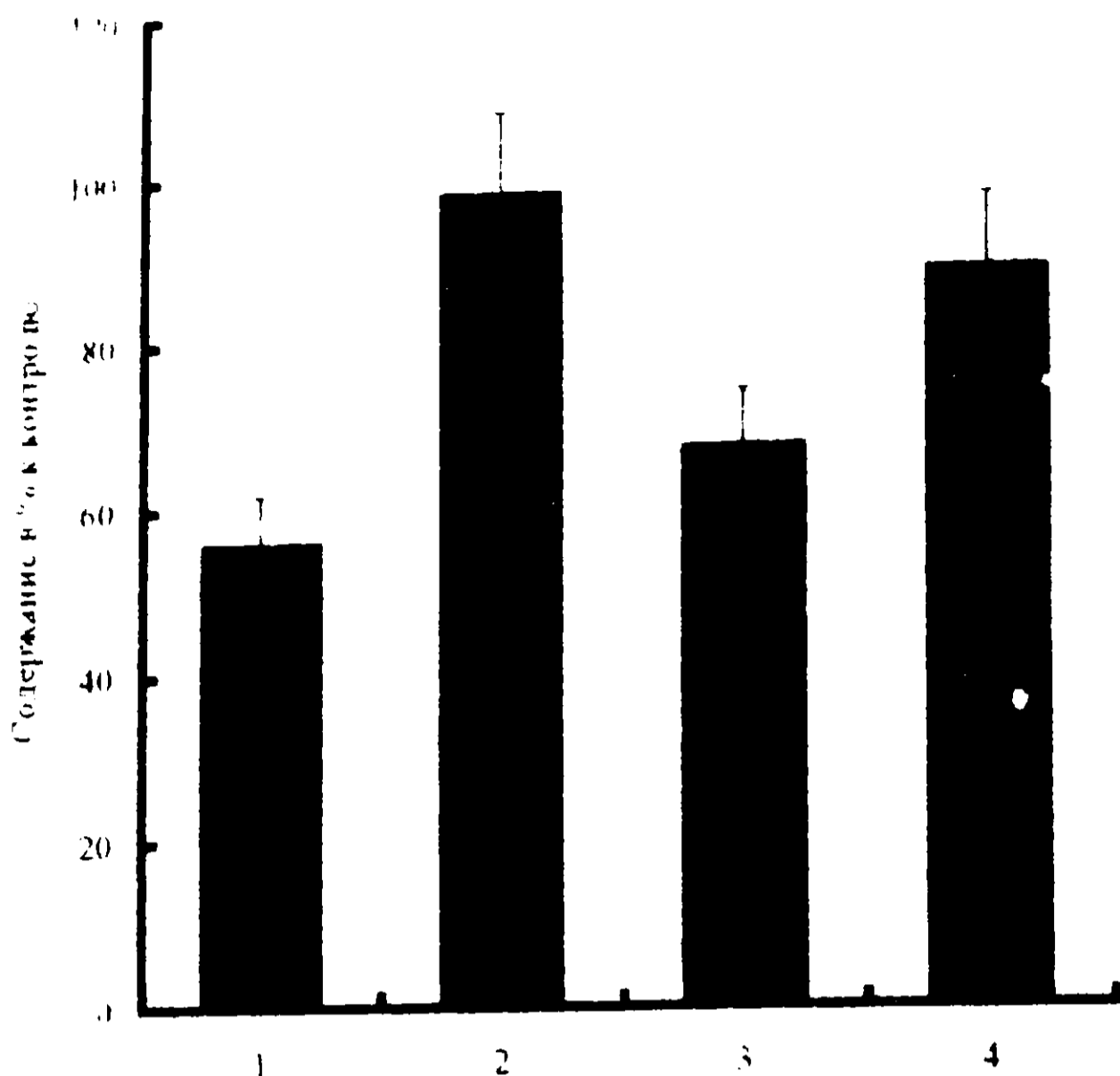


Рис. 4. Изменение содержания белка в разных органах леща за время зимовки. 1 – селезенка, 2 – печень, 3 – жабры, 4 – мышцы.

зано, на наш взгляд, с активной функцией этого органа в отношении синтеза разнообразных веществ, необходимых для поддержания жизнедеятельности организма в период зимовки. В пользу того, что в тканях зимующих рыб не ослабевают процессы биосинтеза, косвенно свидетельствует довольно высокий уровень нуклеаз, особенно в таких активно метаболизирующих органах, как печень и селезенка.

Значительное повышение общей и связанной активности лизосомальных ферментов у голодающих животных может свидетельствовать о синтезе лизосом *de novo*, а наблюдающееся возрастание неседиментируемой активности кислых гидролаз говорит о структурных преобразованиях мембран органелл, их более активном функционировании и интенсивном вовлечении в процессы аутофагии.

Адаптивные перестройки внутриклеточного метаболизма на молекулярном уровне выражаются в изменении фракционного состава некоторых лизосомальных гидролаз. Изучение множественных форм кислой фосфатазы с помощью ионообменной хроматографии на колон-



Рис. 5. Относительная активность молекулярных форм кислой фосфатазы печени радужной форели в контроле (К) и в условиях вынужденного голодания (Г). Гель-хроматография на сефадексе G-200: I – молекулярная масса 295, II – 97, III – 16 кДа.

Здесь и на рис. 6: Г₁ – 19 сут. голода (май), Г₂ – 28 сут. (апрель), Г₃ – 49 сут. (май-июнь)

как с ДЭАЗ-целлюлозой и гель-хроматографии на сефадексе G-200 выявило, что при вынужденном голодании в печени форели происходило повышение относительной активности гетероформы фермента с молекулярной массой около 100 кДа, имеющей лизосомальное происхождение (рис. 5). Кроме того, у голодающих рыб обнаружено перераспределение активности в сторону анионных форм (рис. 6), что свидетельствует об усилении каталитических свойств кислой фосфатазы, для которой характерен механизм кислотного гидролиза. В процессе зимовки у молоди карпа увеличивалась относительная активность высокомолекулярной (300 кДа) формы фермента.

Выработанная в процессе эволюции способность многих видов рыб в определенные периоды переключать метаболизм на эндогенные

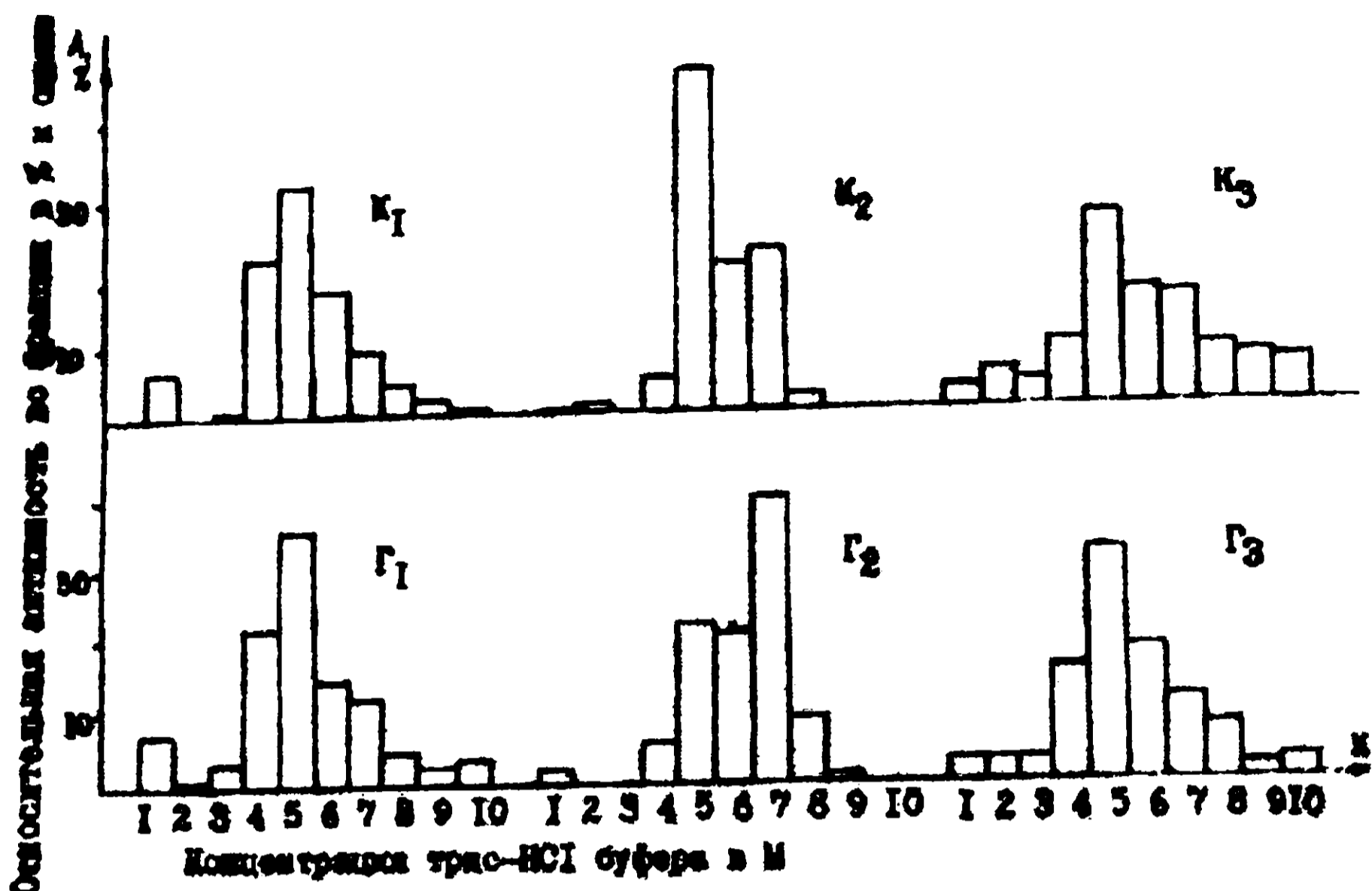


Рис. 6. Фракционный состав кислой фосфатазы печени радужной форели в контроле (К) и в условиях вынужденного голодания (Г). Хроматография на колонке ДЭАЭ-целлюлозы. Концентрация трис-HCl буфера в М: 1 – 0,005; 2 – 0,010; 3 – 0,025; 4 – 0,050; 5 – 0,075; 6 – 0,100; 7 – 0,250; 8 – 0,500; 9 – 0,750; 10 – 1,0

источники пластического и энергетического материала позволила им в конкурентной борьбе за выживание занять определенную экологическую нишу и, в конечном счете, обеспечить сохранение вида. Важнейшая роль в перераспределении питательных веществ и обеспечении необходимого уровня обменных процессов в этот период принадлежит лизосомальному аппарату клетки.

ЛИТЕРАТУРА

- Баранникова И.А. Функциональные основы миграций рыб. Л.: Наука, 1975, 210 с.
- Васильев А.В., Звягина О.П. Влияние длительного голодания на активность катепсинов и некоторых липолитических ферментов печени крыс // Вопросы питания. 1978. № 5, 31-33

- Высоцкая Р.У., Яковлева К.Е., Васильева Т.С., Ломаева Т.А. Некоторые показатели углеводного обмена у животных при голодании // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск. Карел. филиал АН СССР. 1989, 98-104.
- Загорских О.М., Сидоров В.С. Липидный состав органов леща в конце зимовки // Биохимия экто- и эндотермных организмов. Петрозаводск. Карел. филиал АН СССР. 1989, 13-19.
- Коржусев П.А. О биохимических аспектах обмена веществ рыб // Современные вопросы экологической физиологии рыб. М.: Наука. 1979, 11-19.
- Крупнова М.Ю., Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р. Изменение ферментного профиля лизосом у форели при голодании // Укр. биохим. журн. 1985, 57, 62-65.
- Кузьмина В.В. Вариабельность активности некоторых ферментов слизистой кишечника рыб // Журн. эвол. биохим. физиол. 1994, 30, 754-761.
- Немова Н.Н., Сидоров В.С., Рипатти П.О. Лизосомальное переваривание белков органов лосося при голодании в условиях содержания в садках в преднерестовый период // Вопросы ихтиологии. 1980, 20, вып. 1, 180-182.
- Покровский А.А. Роль биохимии в развитии науки о питании. М.: Наука, 1974.
- Руоколайнен Т.Р. Влияние экологических и физиологических факторов на активность кислой фосфатазы пресноводных рыб. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Л.: 1985. 16 с.
- Сидоров В.С. Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука. 1983, 240 с.
- Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. М.: Лег. пищ. пром-сть. 1982.
- Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат. 1993, 238 с.
- Шатуновский М.И. Экологические закономерности обмена веществ морских рыб. М.: Наука. 1980, 283 с.
- Шульман Г.Е. Физиолого-биохимические особенности годовых циклов рыб. М.: Пищ. пром-сть. 1972, 368 с.
- Black D., Love R. The sequential mobilization and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding // J. Comp. Physiol. 1986, B156, 469-479.
- Mazeaud M., Mazeaud F., Donaldson E. Primary and secondary effects of stress in fish // Trans. Amer. Fish. Soc. 1977, 106, 201-212.

БОГДАН В.В., СИДОРОВ В.С., ЗЕКИНА Л.М.

ЛИПИДЫ РЫБ ПРИ АДАПТАЦИИ К РАЗЛИЧНЫМ ЭКОЛОГИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Известно, что липиды чрезвычайно чувствительны к экологическим факторам, что позволяет использовать их характеристики в качестве индикаторов состояния рыб при различных воздействиях. Липиды выполняют в организме разнообразные функции: мембранную, энергетическую, запасную, гормональную, механическую и др. Многогранность функций липидов связана с разнообразием их состава. Липиды, содержащие остатки жирных кислот, относятся к важнейшим химическим соединениям, обеспечивающим как структурную организацию живых систем, так и все процессы их жизнедеятельности. Фосфолипиды являются основным структурным компонентом биологических мембран и во многом определяют свойства последних. При их непосредственном участии протекает транспорт веществ и ионов, трансформация и аккумуляция энергии, передача информации. Фосфолипиды входят в состав сложных мембраносвязанных ферментных систем, регулируя их каталитические функции. Обязательным структурным липидом плазматических и внутриклеточных мембран является холестерин, которому принадлежит важная регуляторная роль в обменных процессах. Он служит источником для биосинтеза ряда биологически активных веществ: желчных кислот, стероидных и половых гормонов, витамина Д. Триацилглицерины и эфиры холестерина составляют резерв липидов в тканях рыб, из которого поступают остатки жирных кислот, холестерин и глицериды, необходимые для модификации фосфолипидов мембран. Они являются также запасным источником энергии, обеспечивающим обменные процессы. Наиболее вариабельными компонентами липидных молекул являются жирнокислотные радикалы, которые во многом определяют физико-химические свойства липидов. Ценным показателем в сравнительно-экологическом плане являются желчные кислоты, которые оказывают многостороннее влияние на обменные процессы в организме животных. Полифункциона-

альность липидов обуславливает необходимость исследования всего комплекса показателей для оценки их роли в адаптациях рыб.

В данной статье будет рассмотрена изменчивость указанных выше групп липидов при действия на рыб различных факторов - биотических, абиотических, антропогенных, с целью выявления общих закономерностей и специфических особенностей их реагирования.

Материалы и методы

Сборные пробы различных тканей рыб фиксировали смесью хлороформа с метанолом (2:1 по объему). Липиды экстрагировали по методу Фолча и фракционировали с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках "Силуфол" в системе растворителей: петролейный эфир-серный эфир-уксусная кислота (90:10:1) (Кейтс, 1975). Количественное определение фосфолипидов, триацилглицеринов и эфиров холестерина проводили гидроксаматным методом (Сидоров и др., 1972). Холестерин определяли по реакции с окрашивающим реагентом Engelbrecht et al., 1974). Фосфолипиды разделяли на пластинках с силикагелем в системе растворителей: хлороформ-метанол-вода (65:25:4). Содержание индивидуальных фосфолипидов проводили по фосфору Rouser et al, 1966).

Метилловые эфиры жирных кислот фосфолипидов получали прямым метилированием в абсолютном метаноле, содержащем 8% хлористого ацетила (Цыганов, 1971) и анализировали на газожидкостном хроматографе "Хром-41" на полярной фазе - 15% Reoplex-40 на Хроматоне N-AW-DMCS. Идентификацию жирных кислот проводили сравнением со временами удерживания метчиков, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными (Jamieson, 1975). Относительное содержание отдельных кислот рассчитывали по Бартлетту и Айверсону (Bartlett, Iverson, 1966).

Свободные желчные кислоты из желчи получали из их конъюгатов и анализировали методом газожидкостной хроматографии в виде метиловых эфиров на 3% фазе OV-17 (Зеклина, Рипатти, 1985). Процентное содержание кислот рассчитывали по площади пиков на хроматограммах. Идентификацию проводили относительно метчиков желчных кислот: холевой, хенодезоксихолевой, дезоксихолевой, литохолевой.

Результаты и обсуждение

В литературе не раз подчеркивалось, что одной из важнейших биологических функций мембранных липидов является приспособительная. Изменение условий обитания или увеличение концентрации чуждых для организма химических веществ вызывают изменения в составе мембранных липидов, обеспечивая нормальное функционирование мембранных структур. Нами получены многочисленные данные, показывающие, что достаточно заметные отклонения в содержании как общих, так и отдельных фосфолипидов в тканях рыб выявляются при экстремальных воздействиях, прежде всего токсикогенной природы. Наибольший интерес при изучении токсического эффекта представляют данные по липидному составу печени, где происходит детоксикация чужеродных веществ и от стабильности структуры которой зависят многие процессы в организме. Как видно из таблицы 1, при хроническом действии промышленных стоков ЦБК и медно-никелевого производства у разных видов рыб происходило увеличение содержания фосфолипидов. Аналогичные результаты получены и другими авторами при действии на рыб пестицидов (Фреймане, Грундуле, 1976). Характерное увеличение фосфолипидов мы наблюдали в печени рыб при изменении температуры воды: при обитании в более холодных озерах у ряпушки и при более низких температурах при зимовке молоди кар-

Таблица 1.

Состав фосфолипидов и триацилглицеринов в печени рыб при токсических воздействиях (в % к сухой массе).

Фактор	Вид рыб	Фосфолипиды		Триацилглицерины	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Стоки ЦБК	сиг	13,3	14,0	1,4	0,9
	лещ	9,0	12,6	2,7	1,7
Стоки ГОКа	щука	26,7	16,4	3,1	6,7
	окунь	18,6	11,8	5,0	0,8
Стоки медно-никелевого комбината	сиг	17,9	12,1	0,8	1,5
Комплексное загрязнение	осетр	4,6	5,3	3,8	0,5
Нитрит Na	карп	10,7	9,9	2,4	2,7

ра. Однако под влиянием инфильтрационных вод ГОКа и комплексного загрязнения (Волго-Каспийский бассейн) отмечено значительное снижение уровня фосфолипидов в печени рыб (табл. 1). В аквариальном эксперименте со стоками ГОКа также обнаружено уменьшение концентрации фосфолипидов у личинок форели, и уменьшение их концентрации в печени (на 63%), мышцах и жабрах окуня. Фосфолипиды печени могли, вероятно, быть использованы в качестве энергетического материала, что отмечалось другими исследователями при крайне неблагоприятных условиях. Однако при хроническом действии стоков ГОКа на рыб такого токсического эффекта не наблюдалось. Низкую выживаемость молоди карпа при близких к нулевой температурах зимовки мы также связываем с уменьшением в печени на 50% количества фосфолипидов. В почках осетров с расслоением мышц при политоксикозе обнаружено почти двукратное уменьшение содержания мембранных липидов. Разрушение мембранных структур происходило в жабрах рыб при действии промстоков ЦБК. Разнонаправленная изменчивость суммарных фосфолипидов при действии различных токсикантов является результатом соответствующей реакции организма рыбы, зависящей от многих факторов, и в частности, таксономического положения рыбы, химической природы токсиканта, его дозы и времени воздействия и др. (Алабастер, Ллойд, 1984). Но если некоторое повышение уровня фосфолипидов можно считать адаптивной реакцией организма, то значительное уменьшение их содержания при действии экстремальных факторов свидетельствует о нарушении структуры мембран различных органов, в особенности печени, почек, жабр, что отражается на их функционировании, в частности, может снижаться эффективность процессов детоксикации. Это подтверждается исследованиями печени у слабых и сильных рыб (в конце зимовки, при действии критических температур и при бактериальной интоксикации), обнаружившими снижение уровня фосфолипидов у физиологически слабых особей.

Состояние мембранных структур во многом зависит от содержания индивидуальных фосфолипидов. При действии различных стресс-факторов мы наблюдали существенные изменения в содержании количественно доминирующих фосфолипидов: фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА), а также лизофосфатидилхо-

лина. Так, уменьшение концентрации ФХ и ФЭА отмечалось под влиянием стоков ГОКа в печени и жабрах щук, у молоди осетра при воздействии смеси тяжелых металлов с нитратами и нитритами, в печени карпа при действии критически низких температур. Снижение уровня фосфолипидов за счет ФХ и ФЭА отмечалось многими исследователями при изучении температурных адаптаций у рыб (Крепс 1981). Такие изменения могли значительно снижать скорости тех реакций, для которых эти фосфолипиды являются эффекторами или кофакторами. Интересным показателем в этом плане является лизофосфатидилхолин (ЛизоФХ) и другие лизосоединения, концентрация которых в тканях рыб при нормальных условиях незначительна. Увеличение содержания лизофосфатидилхолина продемонстрировано нами у рыб как в природных условиях, так и в эксперименте при действии многих неблагоприятных факторов. Показано увеличение ЛизоФХ до 20% в жабрах окуня и печени плотвы при действии отходов ЦБК. Аналогичные изменения сохранились в лизомальной и митохондриальной фракциях печени сига, лосося, плотвы и леща при инкубации с компонентами отходов ЦБК при уменьшении содержания фосфатидилхолина. Увеличение концентрации ЛизоФХ мы обнаружили при обморожении, сдавливании, гипоксии, действии гельминтов, критически низких температурах. Его концентрация во всех органах осетров из Волго-Каспийского бассейна была заметно выше, чем из Енисея (чистая вода), а при расслоении мышц вследствие политоксикоза больше, чем у рыб без патологических признаков. При изучении характера адаптивных перестроек мембранных липидов у рыб к условиям, несвойственным экологии вида, в том числе и интоксикации, В.И.Чернышов (1982) показал, что если действие раздражителя велико по силе и продолжительности, то в цитоплазме и плазме крови постоянно присутствуют гемолитически активные продукты, что мы и наблюдали при различных воздействиях на рыб. Они могут быть причиной нарушения функций биомембран, снижения физиологической эффективности энергетического и угнетения пластического обмена у рыб. Известно, например, что лизофосфатидилхолин в повышенных концентрациях выступает как ингибитор некоторых мембраносвязанных ферментов (Бурлакова и др., 1982). Механизм образования ЛФХ в разных случаях может иметь различные биохимические сочетания, но

всегда должен включать активизацию фосфолипазы А₂, гидролизующей фосфатидилхолин. Обнаруженное нами в некоторых случаях повышение содержания лизолецитина, например, в экспериментах по влиянию стоков ГОКа на тканевые фосфолипиды окуня, сига, форели и действию никеля на эмбриональные стадии сига может быть результатом ингибирующего влияния каких-то токсических веществ на активность фосфолипазы А₂, что отмечалось для ионов цинка и меди.

Нужно отметить, что снижение концентрации кислых фосфолипидов (фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол), отмеченное при некоторых токсических воздействиях на рыб, в частности, фосфатидилсерина в тканях окуня под влиянием стоков ГОКа, может говорить об уменьшении активности Na⁺, K⁺-АТФазы и нарушении водно-солевого обмена, что является одним из первичных патогенетических звеньев токсикоза (Гуныко, Мусс, 1989).

Считается, что при действии неблагоприятных факторов более важным, чем регуляция состава мембран, является поддержание их жидкостности, и здесь важную роль может играть не количество, а соотношение отдельных фосфолипидов. Известно, например, что жидкостность мембран увеличивается при снижении величины отношения ФЭА/ФХ, СФМ/ФХ, что может служить показателем адаптивных перестроек, обеспечивающих нормальное функционирование в стрессовых ситуациях многих мембраносвязанных ферментных систем.

Данные о зависимости содержания холестерина от различных экологических факторов достаточно противоречивы, что продемонстрировано как собственными, так и литературными данными. Более показательным в этом плане представляется величина отношения холестерина к фосфолипидам, от которого зависит состояние многих клеточных процессов. Существует точка зрения, что нарушение их оптимального соотношения приводит к развитию патологических процессов (Полякова, 1977). Так, увеличение индекса холестерин/фосфолипиды влечет за собой повышение вязкости мембран и снижает скорость некоторых ферментативных реакций.

Поскольку содержание эфиров холестерина и холестерина находится в определенной взаимосвязи, то при некоторых патологических состояниях может происходить изменение коэффициента эстерификации, определяемого как отношение содержания эфиров холе-

стерина к холестерину (Атимова и др., 1975). Например, величина эфирохолестеринового коэффициента в печени сигов и лещей при действии стоков ЦБК снижалась в 1,5-2,5 раза.

Общеизвестна важная роль жирных кислот мембранных липидов в развитии адаптивно-компенсаторных реакций и патологических состояний при изменении условий окружающей среды. В организме животных существуют специальные механизмы регуляции клеточного гомеостаза, которые в ответ на изменение условий существования могут менять липидный метаболизм в направлении, обеспечивающем образование и включение в состав мембранных фосфолипидов иных жирных кислот. Основные закономерности изменчивости жирнокислотного состава фосфолипидов рыб под влиянием температуры достаточно четко определены и однозначны, а именно, с понижением температуры среды уменьшается коэффициент ненасыщенности липидов за счет снижения уровня насыщенных кислот и увеличения суммы полиеновых длинноцепочечных кислот, в частности, докозагексаеновой (22:6 ω 3), эйкозапентаеновой (20:5 ω 3) и арахидоновой (20:4 ω 6) (Крепс, 1981). Благодаря увеличению концентрации полиеновых кислот происходит изменение физико-химических свойств мембран из-за значительно более высокой гибкости углеводородных цепей полиненасыщенных жирных кислот (Рабинович, Рипатти, 1994). Однако иногда характер температурных адаптивных перестроек нарушается. Так, в печени и мышцах молоди карпа нами обнаружено уменьшение содержания полиеновых кислот, особенно докозагексаеновой, при снижении температуры воды в зимний период (Богдан, 1986). Такая специфичность в изменчивости жирнокислотного состава липидов определяется, по-видимому, эколого-физиологическими и генетическими особенностями рыб. У большинства исследованных видов увеличение ненасыщенности мембранных липидов в зимний период позволяет поддерживать активность ферментов на достаточно высоком уровне и вести подвижный образ жизни. У карпа уменьшение уровня полиеновых жирных кислот коррелирует со снижением двигательной активности и метаболизма в целом при низких температурах зимовки. Это подтверждается данными, что естественная подвижность рыб даже в большей степени, чем температура, влияет на уровень полиеновых жирных кислот, особенно, докозагексаеновой (Шульман,

Юнева, 1990).

Выяснение роли жирных кислот липидов мембран в адаптивных реакциях гидробионтов к токсическим воздействиям представляет большой интерес в связи с усилением загрязненности водоемов. В таблице 2 представлены полученные нами результаты по изменению суммы полиеновых жирных кислот и, в частности, докозагексаеновой в фосфолипидах печени под влиянием различных токсикантов как в эксперименте, так и в природных условиях. Показано, что экспериментальное повышение концентрации нитрита натрия не вызывало заметных изменений в жирнокислотном составе печени, мышц и жабр карпов, но снижало уровень докозагексаеновой кислоты в фосфолипидах печени. При сравнении жирнокислотных спектров фосфолипидов печени, мышц и жабр опытных и контрольных окуней и личинок сига в аквариальном опыте, печени и жабр радужной форели при садковом содержании также не обнаружено различий в содержании отдельных жирных кислот при действии стоков ГОКа. Однако в мышцах и почках последних наблюдали двукратное увеличение полиненасыщенных

Таблица 2.

Уровень полиеновых жирных кислот (докозагексаеновой кислоты) в печени (в % к сумме кислот) и холатного показателя при токсических воздействиях

Фактор	Вид рыб	Полиеновые (22.6ω ³) кислоты		Холатный показатель	
		контроль	опыт	контроль	опыт
Стоки ЦБК	сиг	-	-	76,2±1,8	62,0±3,8
	лещ	-	-	67,7±1,7	60,9±2,2
	щука	-	-	89,7±4,1	81,5±5,3
Стоки ГОКа	окунь	54,0 (24,8)	55,0 (31,4)	-	-
	щука	63,2 (30,2)	52,9 (25,5)	81,2±2,1	71,1±2,3
Стоки медно-никелевого комбината	сиг	32,7 (6,5)	52,5 (20,3)	-	-
Комплексное загрязнение	осетр	-	-	79,5±3,8	73,7±5,0
	стерлядь	-	-	73,0	61,2
Нитрит Na	каarp	33,8 (15,0)	37,4 (10,2)	-	-

кислот линоленового ряда. У сеголеток радужной форели при разных концентрациях инфильтрационных вод также отмечали увеличение доли полиеновых кислот по сравнению с контролем. Причем особи из варианта с неразбавленными стоками характеризовались наиболее высоким относительным содержанием эйкозатентаеновой и особенно докозагексаеновой кислоты по сравнению с контролем (41,6% и 13,5% соответственно), что коррелировало с уменьшением уровня пальмитиновой кислоты. Сравнение жирнокислотных спектров мембранных липидов у щук при хроническом действии сточных вод ГОКа показало существенное снижение доли полиеновых жирных кислот в мембранах печени и мышц в основном за счет докозагексаеновой кислоты. В жабрах различия в уровне жирных кислот у опытных и контрольных рыб незначительны, что может быть проявлением хронического отравления малыми дозами, не вызывающими гипоксии. У стерляди с расслоением мышечной ткани, вызванном комплексным загрязнением Волго-Каспийского бассейна, также происходило значительное уменьшение в мышцах доли полиеновых кислот относительно экземпляров с нормальной физиологией. Действие сточных вод медно-никелевого производства приводили к увеличению уровня полиеновых кислот в печени и жабрах и снижению в мышцах сига - вида, который отличается высокой устойчивостью к токсикантам.

Ранее отмечалось, что увеличение доли полиеновых кислот в мембранных липидах является универсальным ответом на любое воздействие, направленное на регуляцию метаболических процессов на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях (Шульман, Юнева, 1990). Например, показано, что устойчивость к высоким температурам у осетра связана со снижением отношения пальмитиновой кислоты к сумме 22:4, 22:5, 22:6 кислот с 1,24 до 0,79-0,98 (Дудкин, 1990). Из литературных источников известно, что при некоторых токсических воздействиях происходит смена состава мембранных липидов в сторону преобладания ненасыщенных жирных кислот при возрастании адаптационной пластичности рыб. О тесной связи между уровнем полиеновых жирных кислот и физиологическим состоянием организма свидетельствуют также результаты, полученные в нашей лаборатории. Обнаружено, что содержание этих кислот значительно снижалось при неблагоприятных условиях зимовки (высокой плотности посадки

и предельно низких температурах), у ослабленных после зимовки особей. Таким образом, уровень полиеновых жирных кислот в известной мере отражает напряженность защитной функции. Снижение их содержания можно рассматривать как показатель ее ослабления, а повышение - как мобилизацию защитной реакции. Достаточно стабильный жирнокислотный состав мембранных липидов или повышение уровня полиеновых кислот в проведенных экспериментах дает основание говорить о высокой устойчивости рыб к непродолжительному действию токсикантов. И определяется это оптимизацией структурной организации в первую очередь таких систем, как печень и почки. При этом из всего пула полиеновых кислот преимущественное значение имеет докозагексаеновая кислота, которая выступает в качестве регулятора функционального состояния клеточных мембран, что служит, вероятно, метаболической основой адаптации к различным стресс-факторам. Полиеновые жирные кислоты способствуют сдвигу физико-химического состояния мембран, повышают их жидкость, могут модулировать активность многих мембраносвязанных ферментов. Так, сукцинатдегидрогеназа, АТРаза и многие из ферментов цепи переноса электронов активируются полиеновыми жирными кислотами (Крепс, 1981). Интересен факт ослабления хронического действия фосфора на ферменты цикла Кребса в почках при введении в рацион крыс полиненасыщенных жирных кислот (Кулжыбаев, Меркушева, 1992). Особого внимания в этом плане заслуживает сукцинатдегидрогеназа, активность которой регулируется уровнем докозагексаеновой кислоты. Показано, что ее активность служит важным показателем степени интоксикации. Одним из механизмов адаптации к экстремальным факторам среды является стимуляция сукцинатдегидрогеназной системы вследствие повышения концентрации в клетке ненасыщенных жирных кислот, что лежит в основе последующего повышения интенсивности клеточного дыхания (Кожемякин и др., 1977). Отмеченное уменьшение степени ненасыщенности мембранных липидов, особенно в печени, вследствие снижения уровня полиеновых кислот при хроническом действии различных стресс-факторов свидетельствует о нарушении адаптивно-компенсаторных реакций организма и может рассматриваться как предпатология или патология.

Запасные липиды (триацилглицерины и эфиры холестерина)

достаточно отзывчивы на действие как относительно слабых (сезонные, годовые, территориальные флуктуации), так и сильных экологических факторов. Под влиянием различных биотических факторов (резкие колебания температуры, зимовка, голодание, нерест, миграции) происходило уменьшение содержания триацилглицеринов в тканях, прежде всего в мышцах и внутреннем жире. Правда, при длительном действии экстремального фактора на молодь карпа в период зимовки (близкой к нулевой температуре) нарушалась утилизация триацилглицеринов в мышцах, а интенсивнее они расходовались в печени (Богдан, 1986). Полученные нами результаты по влиянию различных токсикантов на рыб в аквариальном эксперименте также показали, что липидный обмен характеризовался гидролизом резервных триацил-глицеринов преимущественно из органов, являющихся жировыми депо, вероятно вследствие увеличения энергетических трат из-за изменения направленности большинства метаболических систем организма и обмена веществ в целом. Что касается эфиров холестерина, то однозначно определить их роль затруднительно, хотя бы исходя из данных по влиянию стоков ЦБК, показавших, что содержание эфиров холестерина в печени уменьшалось у лещей, но увеличивалось у сигов.

Наибольшую ценность для понимания механизмов адаптации рыб к токсическому действию представляли результаты анализа тканевых липидов у рыб из природных условий (табл. 1). Анализ липидов щуки показал различную изменчивость запасных липидов в разных тканях при хроническом действии сточных вод ГОКа. Наибольшие отклонения отмечены для печени, в которой значительно увеличилось содержание триацилглицеринов при некотором снижении уровня эфиров холестерина. Мышцы опытных и контрольных рыб по уровню нейтральных липидов практически не различались, в то время как в жабрах наблюдали некоторое снижение концентрации триацилглицеринов. У радужной форели при двухмесячном садковом эксперименте отмечено увеличение в печени и мышцах количества триацилглицеринов у рыб при действии отходов ГОКа. В почках наблюдали уменьшение содержания запасных липидов, а в жабрах и внутреннем жире изменений не обнаружено. При изучении хронического действия тяжелых металлов на сигов из озер, загрязненных сточными

водами медно-никелевого производства в печени и жабрах отмечено увеличение содержания триацилглицеринов и эфиров холестерина при значительном накоплении никеля, меди, цинка и марганца. В мышцах происходило снижение уровня триацилглицеринов. На липотропное действие промышленных стоков в природных условиях указывали и другие авторы, которые связывали этот эффект с тяжелыми металлами (Федоненко, 1993). Исследованиями И.О. Евтушенко (1985) было установлено, что повышенные концентрации цинка в воде при продолжительном его воздействии на организм рыб оказывают активирующее влияние на синтез липидов, вызывая усиленное накопление триацилглицеринов в печени и мышцах. Жировое перерождение гепатоцитов печени тилпии обнаружено при действии сублетальных доз Cd (Usha, Ramamusthi, 1989). При ряде заболеваний у рыб нами также показано значительное повышение уровня триацилглицеринов в тканях рыб, возможно, вследствие интоксикации. В то же время у сигов и лещей из Выгозера, загрязненного стоками ЦБК, у волжских осетров с расслоением мышц вследствие политоксикоза наблюдали снижение уровня триацилглицеринов в печени, но в почках у последних почти в два раза повышено их содержание по сравнению с контрольными экземплярами. Таким образом, при изменении различных экологических условий, в том числе и антропогенного происхождения, происходило уменьшение содержания триацилглицеринов, которые быстро мобилизуются из жировых депо и служат в качестве источника энергии (Сидоров, 1983). Поскольку реакция рыб на различные воздействия протекает по механизму стрессовой реакции, то усиление липолиза можно считать характерной реакцией на действие любого стресс-фактора. Однако длительное воздействие некоторых токсических веществ, содержащихся в промышленных стоках, формирует хронический стресс, особенностью которого могут быть нарушения в регуляторных системах организма, которые выражаются в изменении уровня нейтральных липидов и имеют видовую и тканевую специфичность. Характерным признаком длительного воздействия промышленных стоков для некоторых изученных нами видов явилось повышение уровня триацилглицеринов в печени. Увеличение количества запасных липидов при снижении фосфолипидов можно объяснить нарушением синтеза фосфолипидов из-за недостаточного образования или

поступления липотропных веществ (холин, метионин). При дефиците последних синтез фосфолипидов из компонентов нейтральных жиров заметно снижается и триацил-глицерины откладываются в печени. Наиболее выраженный липотропный эффект, например, для марганца проявлялся при недостатке холина.

Определение состава желчных кислот для оценки эколого-физиологической обстановки представляет значительный интерес в связи с их важной физиологической ролью, которую можно свести к трем главным функциям: пищеварительной, регуляторной и защитной. Ранее нами показано, что количество желчных кислот, особенно относительная доля холевой кислоты, и холестерина в желчи рыб зависит от различных условий, в том числе от температуры, характера питания и голодания рыб. Причем изменения в составе желчных кислот при температурах значительно ниже оптимальных, аналогичны изменениям при других неблагоприятных воздействиях и характеризуются угнетением процессов окисления холестерина до желчных кислот. Обнаружена также сезонная и популяционная вариабельность холатного показателя, определяемого как отношение содержания холевой кислоты к сумме всех желчных кислот в желчи рыб (Сидоров, 1983). Данный показатель особенно интересен в том плане, что в окислении холестерина до холановых кислот и их конъюгировании до таурохолановых участвуют те же ферменты, что и в детоксикации ксенобиотиков (монооксидазы, цитохром Р-450, конъюгазы). Поэтому при адаптивном росте активности этих ферментов в ответ на токсическое воздействие происходит изменение количественного соотношения моно-, ди- и трихолановых кислот в желчи. Исследования желчнокислотного состава желчи рыб проведено нами при различных антропогенных воздействиях (табл. 2). В частности, у сига и щуки, отловленных в Выгозере, загрязненном отходами ЦБК, величина холатного показателя, определяемого в основном концентрацией холевой кислоты, оказалась ниже, чем у рыб из чистых водоемов. Аналогичное уменьшение холатного показателя обнаружено у осетра и стерляди при расслоении мышц, вызванном политоксикозом. Одновременно происходило заметное возрастание коэффициента вариабельности холатного показателя, что характеризует наличие различной индивидуальной реакции на действующий фактор и коррелирует с усилением

загрязненности воды. Так, у 7 видов рыб при действии отходов ЦБК коэффициент вариабельности в 1,5-3 раза превышал таковой у контрольных особей. Результаты аквариального опыта по действию промышленных стоков ГОКа на окуней показали снижение концентрации холевой кислоты в два раза при значительном увеличении холестерина по сравнению с контрольными особями. Такая же закономерность отмечена и для щук, обитающих в загрязненном стоками комбината озере. Проведенные исследования дают основания полагать, что указанные изменения состава желчных кислот представляют собой результат нарушения обменных процессов в печени, развивающихся при стрессовых воздействиях, следствием которых является снижение синтеза холевой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

- Алабастр Д., Ллойд. Критерии качества воды для пресноводных рыб М.: Легк. и пищ. пром-сть. 1984. 343 с.
- Алимова Е.К., Аствацатурьянц А.Т., Жаров Л.В. Липиды и жирные кислоты в норме и при ряде патологических состояний. Медицина. 1975. 280 с.
- Богдан В.В. Липиды молоди карпа в процессе зимовки // Автореф. канд. дис. Харьков, 1986. 16 с.
- Бурлакова Е.Б., Джалябова М.И., Гвахария В.О., Глущенко В.Н., Молочкина Е.Н., Штолько В.Н. Влияние липидов мембран на активность ферментов // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., Наука. 1982. 113-140.
- Гулько С.В., Мус Н.Ф. Активность Na, K -АТФазы как один из критериев в выделении группы риска по развитию позднего токсикоза при скрининге беременных // Вопр. мед. химии. 1989. 35, 114-117.
- Дудкин С.И. Биологические и синтетические антиоксиданты как неспецифические адаптогены рыб // II Симп. по экол. биохимии рыб. Тез. докл. Ярославль. 1990. 78-79.
- Евтушенко Н.Ю. Физиологическое значение отдельных микроэлементов в механизмах регуляции липидного обмена у рыб // Экол. физиол. и биохимия рыб. Тез докл. Всес. конф., Вильнюс. 1985. 71-75.
- Зекина Л.М., Рипатти П.О. Газохроматографическое изучение желчных кислот рыб // Биохимия молоди преснов. рыб Петрозаводск, 1985. 85-87.
- Кейтс М. Техника липидологии. М. Мир. 1975. 322 с.
- Кожемякин Л.А., Коростоецев Д.С., Королева Т.Р. Циклический аденозин-3,5 - монофосфат в органах и тканях в процессе адаптации организма к экстремальным воздействиям // Бюлл. exper. биол. и мед. 1977. 11,

- Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 1981, 339 с.
- Кулкыбаев Г.А., Меркушева Н.В.* Влияние полиненасыщенных жирных кислот на цикл Кребса в почках крыс в условиях хронической фосфорной интоксикации // *Вопр. питания.* 1992. 2, 51-53.
- Полякова Э.Д., Докусова О.К., Петрова Л.А.* О начальных этапах биосинтеза холестерина. Роль В-окси- В- глутарил-КоА-редуктазы в регуляции биосинтеза холестерина из 2 -14С- малонил-КоА // *Липиды в организме животных и человека.* М.: Наука. 1974, 101-109.
- Рабинович А.Л., Рипатти П.О.* Полиненасыщенные углеводородные цепи липидов: структура, свойства, функции // *Успехи соврем. биологии.* 1994. 114, 581-594.
- Сидоров В.С.* Экологическая биохимия рыб. Липиды. Л.: Наука. 1983. 240 с.
- Федоненко Е.В.* Влияние антропогенного загрязнения на биохимические показатели половых продуктов плотвы Запорожского водохранилища // *Вестн. Днепропетр. ун-та. Днепропетровск.* 1993, 201.
- Фреймане Т.Х., Грундуле М.В.* Количественные сдвиги липидных фракций в организме карпа под воздействием ланлана и ДДТ // *Экспериментальная водная токсикология.* Рига. 1976. 248-254.
- Цыганов Э.П.* Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // *Лаб. дело.* 1971. 8, 490-493.
- Чернышов В.И.* Этиология и профилактика свободно-радикальной патологии при физиологической адаптации рыб к условиям, несвойственным экологии вида // *Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии.* М.: Наука. 1982. 141-155.
- Шульман Г.Е., Юнева Т.Р.* Роль докозагексаеновой кислоты в адаптациях рыб // *Гидробиол. журн.* 1990. 26, 43-51.
- Bartlett J., Iverson J.L.* Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // *J. Assoc. offic. analytical chem.* 1966. 49, 21-27.
- Engelbrecht F.M., Mori F., Anderson I.T.* Cholesterol determination in serum. A rapid direct method // *S. A. Med. J.* 1974. 48, 250-256.
- Jamieson G.R.* GLC-identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // *J. Chromatogr. Sci.* 1975. 13, 491-497.
- Rouser G., Siakotos A.N., Fleischer S.* Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorous analysis of spots. // *J. Lipids,* 1966. 1, 85-86.
- Usha B.A., Ramamusthi R.* Histopathological alteration in the liver of freshwater teleost *Tilapia mossambica* in response to cadmium toxicity // *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* 1989. 17, 221-226.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Пашанина РАН, Борок

В настоящее время можно считать доказанным, что механизм ионной регуляции выполняет у пресноводных рыб одновременно несколько важнейших функций, обеспечивающих гомеостаз внутренней среды. В наших исследованиях установлено, что скорость выхода и поглощения натрия, калия, кальция зависит от ионного состава воды. Процессы утечки ионов и их поступления регулируется в широком диапазоне. Специфика и интенсивность ионных потоков в жабрах рыб зависят от экологических условий. В первую очередь это относится к природным факторам окружающей среды.

Особенности ионного обмена у пресноводных рыб

Заселение пресных вод костистыми рыбами и последующая их эволюция были бы невозможны без формирования физиологических механизмов, обеспечивающих гомеостаз осмотической концентрации и ионного состава внутренней среды. Различные аспекты ионной и осмотической регуляции у костистых рыб изучались многими авторами, по этому вопросу опубликован ряд обзорных работ (Kloog, 1939; Гинецинский, 1964; Проссер, 1977; Kirschner, 1978; Наточин, Лаврова, 1984; Матей, 1986). Гиперосмотичность внутренней среды у рыб поддерживается за счет высоких, по сравнению с внешней средой, концентраций Na^+ и Cl^- (120-150 ммоль/л). Содержание ионов K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} значительно ниже (1,5-5 ммоль/л). Вследствие большого градиента концентраций между внутренней и наружной средой NaCl диффундирует в воду. Часть этих ионов выводится из организма с мочой. Ренальные потери Na^+ и Cl^- в норме у рыб составляют 10-20% от величины их общей потери (Пора, Прекурн, 1960; Mc Donald, Wood, 1981). Величина общей потери других ионов значительно ниже, чем Na^+ и Cl^- . Наряду с потерей солей у рыб наблюдается поступление

воды в организм по осмотическому градиенту. Другими словами в пресной воде постоянно происходит обессоливание и гипергидратация организма. Этим физико-химическим процессам противостоят физиологические механизмы, требующие затраты энергии и обеспечивающие транспорт солей из внешней среды, удаление избыточной воды из организма и регуляцию проницаемости покровов. Костистые рыбы в пресной воде практически не пьют воду, выделяют гипотоническую мочу и поглощают натрий и хлор непосредственно из воды через жабры (Smith, 1930; Krogh, 1937). Эта модель, предложенная в тридцатые годы, остается в основном верной и в настоящее время. Пресноводные костистые менее проницаемы для ионов, чем морские (Evans, 1967, 1969) и более проницаемы для воды (Potts, 1970). При помещении эвригалинных рыб из морской воды в пресную проницаемость жабр для ионов многократно снижается, а осмотическая проницаемость для воды увеличивается. А. Круг (Krogh, 1939) впервые предположил, что поглощение Na^+ и Cl^- пресноводными рыбами осуществляется параллельно, но не связано друг с другом, а ионы NH_4^+ и HCO_3^- , образующиеся в процессе метаболизма, обмениваются в жабрах на Na^+ и Cl^- внешней среды. Такой электронейтральный обмен энергетически выгоден, так как он уменьшает энергетические траты на транспорт Na^+ и Cl^- и способствует удалению NH_4^+ и HCO_3^- , которые так или иначе должны выводиться из организма. В последующие годы это предположение нашло подтверждение в ряде работ (Maetz, Garsia-Romeu, 1964; Maetz, 1971, 1973). Было установлено, что поглощение натрия из воды связано не только с перемещением NH_4^+ , но и H^+ (Kerstetter et al., 1970). В настоящее время имеется множество доказательств наличия у пресноводных костистых рыб, как $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, так и Na^+/H^+ , NH_4^+ и Na^+/H^+ обменных процессов (Maetz, 1973; Payan, 1978; Виноградов, 1979; Турстон и др., 1979). К сожалению, некоторая противоречивость результатов и малое число исследованных видов рыб не позволяет ответить на вопрос: чем определяется тот или иной тип обмена - экологией, систематической принадлежностью, физиологическим состоянием, стено- и эвригалинностью. В этой связи важно подчеркнуть, что схема экскреции NH_4^+ и HCO_3^- - важное звено в кислотно-щелочной регуляции. Этот механизм, как полагают, может управлять интенсивностью поглощения натрия и хлора. Поглощение натрия снижает аци-

доз, а хлора - алколоз (Heisler, 1982)

Таким образом, жабры берут на себя, в известной мере, роль аналога почек наземных позвоночных и являются основным местом экскреции продуктов азотистого обмена (Evans, 1975, 1979). Около 90% образуемого в организме NH_4^+ выделяется через жабры (Пора, Прекуп, 1960; Maetz, 1973; McDonald, Wood, 1981). В этой связи интересно отметить, что присущие пресноводным рыбам ионно-обменные механизмы обнаружены и в жаберном эпителии морских костистых рыб (Evans, 1975; Carrier, Evans, 1976). На основании этих результатов высказано предположение, что первичный ионообменный механизм пресноводного типа, по крайней мере у рыб, сформировался на основе экскреции метаболитов и поддержания кислотно-щелочного баланса (Evans, 1975; 1979). Во всяком случае, данные о наличии поглощения натрия у морских рыб, сопряженных с удалением H^+ и NH_4^+ , дают повод для размышлений химических особенностях внешней среды, в которой происходило формирование костистых рыб, и позволяют полагать, что в зоне обитания предков костистых могла существовать такая ситуация, когда эффективность экскреторных механизмов была не менее важной, чем поглощение натрия и хлора.

Кинетика поглощения натрия из внешней среды описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Величина константы полунасыщения (K_m) у отдельных видов рыб находится в пределах 100-800 мкмоль/л Na^+ (Maetz, 1973; Payan, 1978; Виноградов и др., 1983; Виноградов, Комов, 1985). В отличие от обменов натрия и хлора, основные закономерности которых довольно хорошо изучены, физиологические механизмы обмена других ионов практически не исследовались. В большей мере известны данные относительно обмена кальция между организмом и средой. Способность рыб поддерживать постоянный уровень концентрации кальция в крови независимо от его содержания в окружающей среде в настоящее время можно считать доказанной. Известно, что основная часть Ca^{2+} (от 80 до 100%) поступает в организм рыб непосредственно из воды (Кирпичников и др., 1956; Шеханова, 1956), причем от 70 до 90% поглощения кальция из воды осуществляется через жабры (Богоявленская, 1955). Однако, транспорт кальция в жабрах рыб, являющийся по существу основным поставщиком ионов Ca^{2+} , мало изучен. Что же касается транспорта ионов калия

и магния, то этот вопрос остается в настоящее время нерешенным из-за малочисленности и противоречивости результатов, несмотря на то, что в ряде работ приводятся доказательства наличия поглощения K^+ и Mg^{2+} из пресной воды (Лаврова и др., 1976; Виноградов и др., 1983; Виноградов, Комов, 1985; Евтушенко, Борисюк, 1985). Величина скорости общей потери натрия у разных видов костистых рыб существенно различается. Наименьший уровень потери Na^+ наблюдается у двухлесток семги, наибольший у плотвы (рис. 1). Окунь, карась и карп занимают по этому показателю промежуточное положение. Поглощение Na^+ у семги превышает потери этого иона при концентрации Na^+ в воде у семги - 25, окуня - 40, колюшки - 80, карася и карпа - 100, плотвы - 200 мкмоль/л.

По нашим данным кинетика поглощения Ca^{2+} у различных видов костистых рыб в общих чертах сходна с кинетикой поглощения Na^+ . Однако, имеются и значительные различия. Величина K_m для Ca^{2+} несколько выше K_m для Na^+ . Отношение

$$\frac{V_{\max}Na^+}{V_0Na^+} = 1,2-1,6, \text{ а } \frac{V_{\max}Ca^{2+}}{V_0Ca^{2+}} > 10, \text{ где}$$

V_{\max} - максимальная скорость поглощения Na^+ или Ca^{2+} , V_0 - скорость общей потери Na^+ или Ca^{2+} (Виноградов, 1988).

Другими словами, транспорт Na^+ у рыб в диапазоне его концентраций, типичных для пресноводных вод, в норме незначительно превосходит потери этого иона. Поглощение Ca^{2+} многократно превышает его потери. Именно благодаря этому и оказывается возможным, вероятно, постоянное накопление и депонирование кальция в различных органах и тканях. Сравнительный анализ кинетики поглощения Na^+ и Ca^{2+} показывает, что, в отличие от Na^+ -транспортирующих систем, которые близки к насыщению при 200-300 мкмоль/л Na^+ , сорбция Ca^{2+} достигает максимальной скорости при более высоких концентрациях Ca^{2+} в воде. Очевидно, оптимальные величины содержания Ca^{2+} в воде, при которых полностью удовлетворяются потребности организма в Ca^{2+} , составляют для отдельных видов пресноводных рыб от 400 до 1000 мкмоль/л Ca^{2+} . У рыб, обитающих в воде с более низкой концентрацией, возможно возникновение дефицита Ca^{2+} при недос-

тажке пищи, в период созревания гонад, во время интенсивного роста на ранних стадиях онтогенеза

В отличие от костистых рыб, у осетровых ионный обмен между организмом и средой до настоящего времени фактически не изучен. Исследование обмена натрия у ленского осетра позволило установить, что зависимость скорости поступления натрия из воды в организм у осетра существенно отличается от таковой у костистых рыб. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация натрия в воде, при которой наступает баланс и полунасыщение (K_m), у осетра значительно выше, чем у костистых рыб (рис. 1). К такому выводу позволяют прийти многочисленные литературные данные относительно обмена натрия у пресноводных костистых рыб, кинетика поглощения натрия у которых находится в пределах, отмеченных на рис. 1 кривыми 1 и 2. В этой связи уместно высказать предположение, что молодь осетра зависит от концентрации натрия в воде в большей степени, чем молодь костистых рыб.

Известно, что интенсивность поглощения кальция у костистых рыб в значительной степени зависит от концентрации магния в воде (Виноградов, Комов, 1987). Опыты по изучению обмена кальция у осетра позволили установить ряд закономерностей. Кинетика погло-

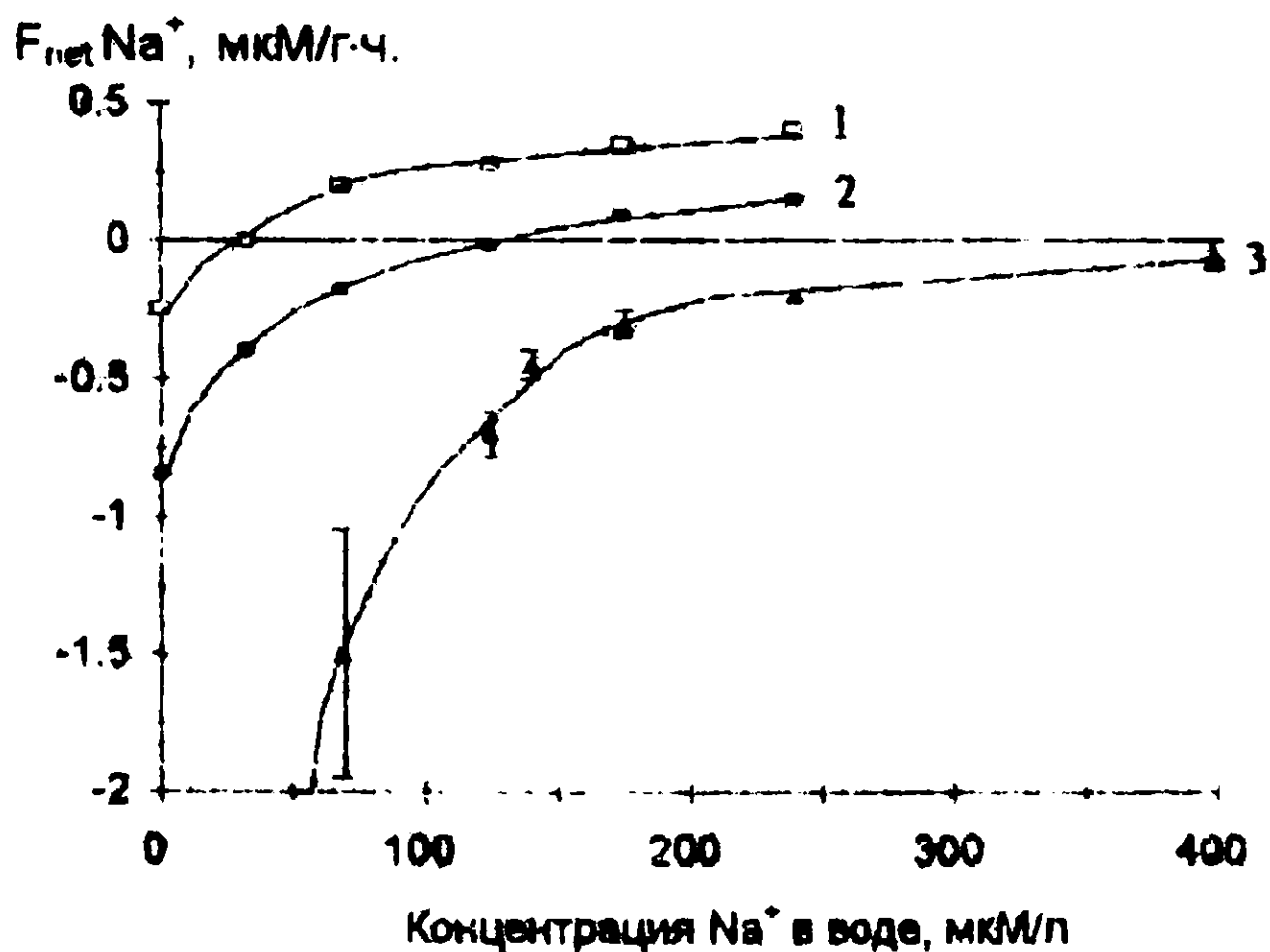


Рис. 1 Чистый поток натрия (F_{net}) у костистых рыб и ленского осетра в зависимости от содержания натрия в воде. Концентрация Ca^{2+} в воде в опытах с осетром приведена в мкМ/л. 1 - семга, 2 - плотва, 3 - осетр.

щения кальция у осетра принципиально не отличается от таковой у пресноводных костистых рыб (рис. 2). Увеличение концентрации магния в среде приводит к тем же последствиям, что и у костистых рыб. По-видимому, на основании полученных данных можно сделать вывод: изменение соотношения концентраций $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, вызывает уменьшение абсорбции кальция у осетров из воды, особенно при концентрации кальция в среде менее 4 мг/л. Величина общей потери калия у осетра значительно ниже общей потери натрия. Полученные

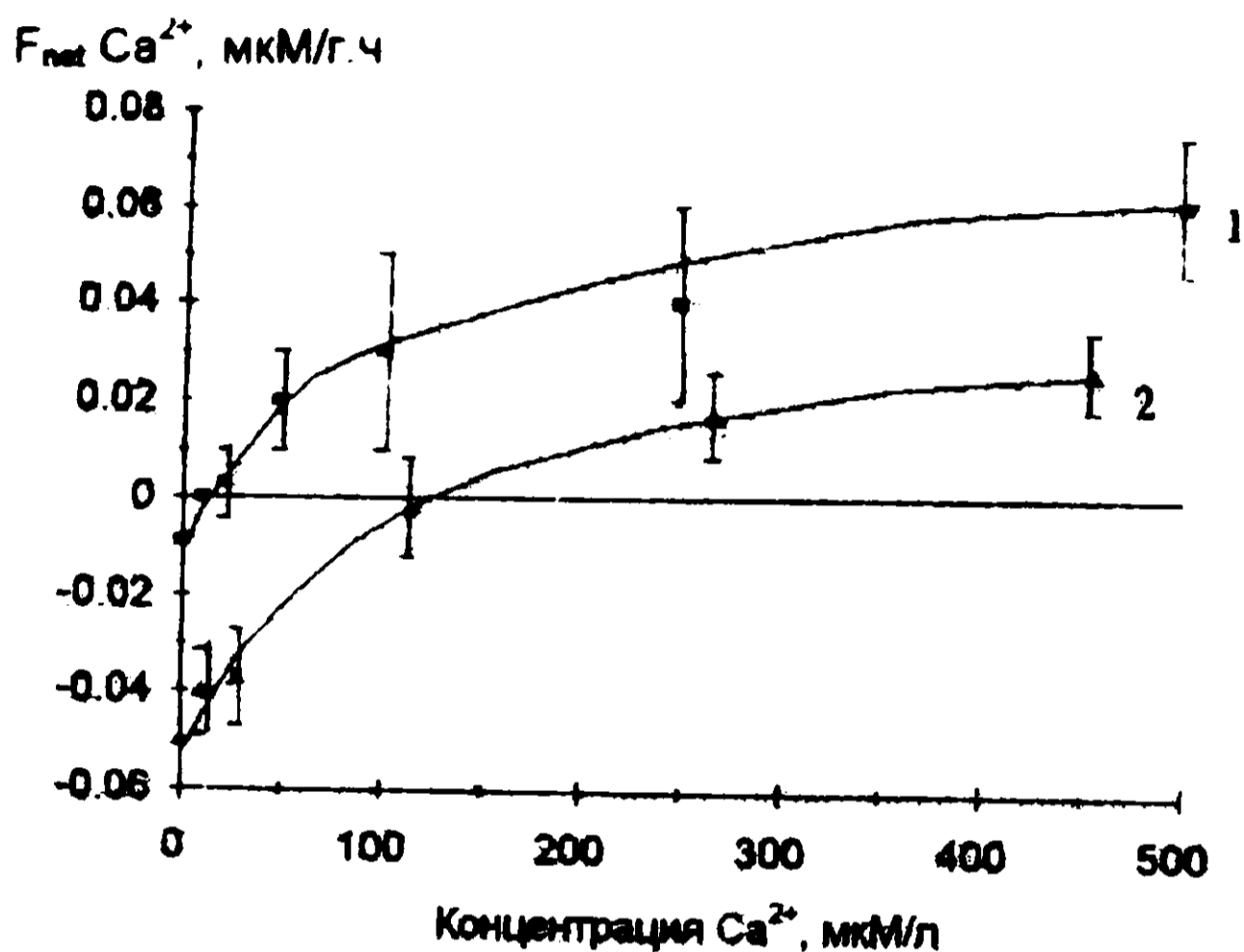


Рис. 2. Влияние магния на поглощение кальция у осетра. 1 - раствор CaCl_2 , 2 - раствор $\text{CaCl}_2 + 200$ мкМ MgCl_2 .

результаты позволяют заключить, что обмен калия у осетра (кинетика поглощения, величина потери в дистиллированной воде) практически не отличается от обмена калия у костистых рыб. По-видимому, часть калия поступает из воды, часть - с пищей. Таким образом, анализ результатов по ионному обмену у ленского осетра позволяет подметить две особенности, не свойственные костистым рыбам. Во-первых, более высокий уровень потери натрия из организма и более низкое сродство жаберных натрий-абсорбирующих меха низмов к ионам натрия. Во-вторых, более низкая, чем у костистых рыб, интенсивность поглощения кальция из воды.

Влияние хендлинга и температуры на процессы ионной регуляции

Эксперименты проводились на карпах весом 50-80 г и радужной форели весом 100-140 г. Оба вида до опытов находились в одинаковых условиях. Рыб кормили и содержали в садках с проточной водой. В качестве стрессорного фактора применяли хендлинг. Здесь следует отметить, что мы употребляем слово "хендлинг" для обозначения особого вида стрессоров, которыми являются процедуры по перемещению рыб различными искусственными способами. Необходимость применения этого термина обусловлена тем, что при экспериментальной работе именно этот вид стрессоров является наиболее обычным в связи с постоянной необходимостью перенесения рыб после акклиматизации к лабораторным условиям и в ходе самих опытов из одной емкости в другую. Взятие рыб в руки (этимология термина) и тому подобные процедуры, оказывающие однотипное стрессорное действие, исследованы в настоящей работе. Определение ионного обмена между рыбами и средой проводилось по методике описанной ранее (Виноградов, 1990; Виноградов, Клерман, 1987).

Проведенные исследования показали, что наиболее сильное влияние хендлинг оказывает на скорость общей потери натрия (F_{loss}). Она резко возрастает в начальный период стресса (рис. 3), составляя 0,8 мкМ/г в час у карпа и 1,5 мкМ/г в час у радужной форели. Чистый поток натрия (F_{net}), характеризующий разницу между потерей натрия из организма и его поглощением из воды, изменяется в меньшей степени. Именно величина скорости чистого потока натрия дает представление о нарушениях гомеостаза у рыб. Если величина F_{net} отрицательна - это значит, что из организма выходит больше натрия, чем его поступает из воды и в конечном счете может привести к дефициту натрия и гибели рыб.

После первоначального дисбаланса обмена натрия происходит его постепенная нормализация (восстановительный период стресса). Следует отметить, что наблюдаются значительные различия в ионном обмене карпа и форели при хендлинг-стрессе, которые выражаются, как в величине отклонения скорости потери натрия, так и в длительности периода необходимого для нормализации регуляции натрия. У

$F_{\text{aut}} \text{ Na}^+$ и $F_{\text{net}} \text{ Na}^+$, мкМ/г ч

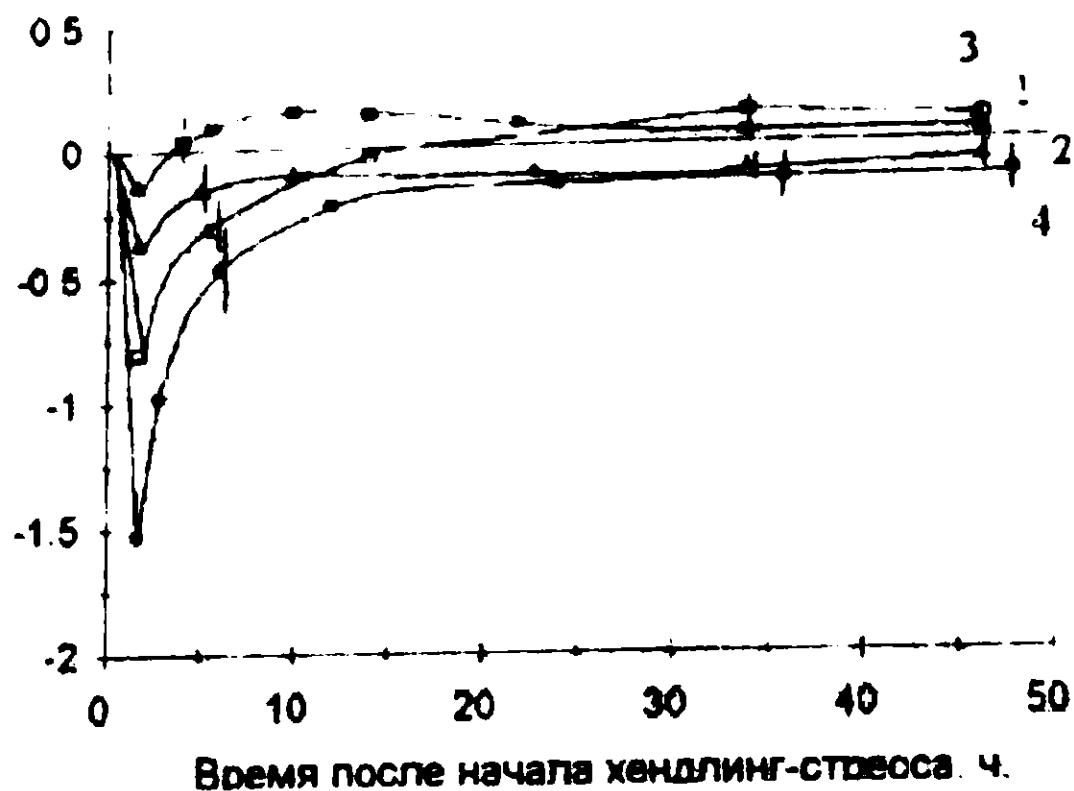


Рис. 3. Общие потери натрия в дистиллированной воде (F_{aut}) и чистый поток (F_{net}) в речной воде у рыб при хендлинг-стрессе. 1 - F_{net} , карп, 2 - F_{aut} , карп, 3 - F_{net} , форель, 4 - F_{aut} , форель.

форели стрессорная реакция выражена в большей степени, чем у карпа, компенсаторное изменение в ионном обмене у карпа происходит в более короткие сроки.

Отмеченные в наших экспериментах количественные закономерности динамики ионного обмена при стрессе позволяют объяснить причину уменьшения концентрации натрия в плазме крови у рыб, так как дисбаланс по натрию в начальный период стресса достигает величин, сравнимых с содержанием этого иона в тканях рыб. В отдельных случаях стрессорное нарушение баланса натрия и уменьшение его содержания в организме до 50% от нормы может даже служить причиной гибели животных. Время, необходимое для нормализации ионного обмена при стрессе такого типа, который мы изучали в настоящей работе, составляет приблизительно 1,5-2 суток, что совпадает со сроками стабилизации содержания ионов в тканях после отлова рыб.

Многочисленные исследования по влиянию хендлинг-стресса позволили установить, что обмен калия изменяется в общих чертах так же, как и обмен натрия (Виноградов, Клерман, 1987). В то же время никаких эффектов хендлинга на обмен кальция у рыб нами не было выявлено. По-видимому, стрессорный фактор вызывает усиленную утечку натрия и калия из организма в основном за счет увеличения их

диффузии во внешнюю среду через жаберный эпителий, проницаемость которого резко возрастает при стрессе. Эти изменения не затрагивают обмен кальция, что свидетельствует о различных гормональных регуляторных механизмах, контролирующих обмен этих катионов.

Доказано, что при резкой смене температуры воды изменяется концентрация отдельных минеральных элементов в крови, приводящая иногда к гибели рыб (Смит, 1986). В связи с этим был изучен механизм действия быстрой смены температуры воды на обмен натрия и кальция у рыб. Резкое изменение температуры с 3 до 20°C вызывает у карпа сильный дисбаланс в обмене натрия, главным образом, за счет значительного усиления общей потери этого иона. Через одни сутки баланс натрия восстанавливается. Нормализация натриевого обмена осуществляется благодаря увеличению интенсивности поглощения натрия из среды. Быстрое снижение температуры на 10°C также приводит к дисбалансу в обмене натрия - превышению уровня общей потери натрия из организма над его поступлением. Однако, в этом случае нормализация процессов осмо-натриевой регуляции происходит в значительно более длительные сроки и сопровождается большими утечками натрия из организма. В основе процесса адаптации к низким температурам лежит постепенное уменьшение скорости общей потери натрия, вероятно, за счет снижения проницаемости эпителия жабр. Следовательно, приспособление карпа к понижению и повышению температуры осуществляется на уровне натриевой регуляции различными физиолого-биохимическими механизмами. Другая примечательная особенность - присутствие неспецифической стрессорной реакции, которая заключается в дополнительном увеличении выхода натрия из организма. Наиболее отчетливо стрессорный характер воздействия проявляется при резком снижении температуры. Расчеты показывают, что в результате избыточной утечки натрия во внешнюю среду происходит значительное обессоливание рыб.

Температурная зависимость обмена кальция носит совершенно другой характер. Колебания температуры в ту или иную сторону на 10°C изменяют скорость поглощения кальция в 2,0-2,4 раза. Следует подчеркнуть, что при температуре около 3°C поступление кальция в организм практически прекращается. Уровень потери кальция в мень-

шей мере зависит от температуры. Стрессорных ответов на резкие сдвиги температуры в кальциевом обмене не обнаружено.

Процесс адаптации карася к изменению температуры протекает более динамично. При одинаковой амплитуде колебаний температуры нормализация обмена натрия заканчивается у карася в более короткие сроки. Избыточная утечка натрия из организма продолжается не более двух часов. Стрессорные изменения в обмене натрия при резких сменах температуры у карася значительно меньше, чем у карпа. Таким образом, обмен кальция, в отличие от обмена натрия, не подвержен стрессорным воздействиям. Снижение температуры вызывает более существенное отклонение от нормы в обмене натрия, чем ее повышение.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что значительные, внезапные температурные воздействия изменяют концентрацию и распределение электролитов в теле рыб (Reaves et al., 1968; Eddy, 1981). Умеренное колебание температуры вызывает незначительные изменения содержания электролитов в крови у рыб. Например, у карасей, адаптированных к 5°C, концентрация натрия в крови была намного ниже по сравнению с рыбами, акклимизированными к 15°C (Eddy, 1981). Результаты наших исследований согласуются с приведенными литературными данными и позволяют заключить, что причиной некоторого снижения концентрации натрия в крови при резком изменении температуры воды может быть более высокая температурная зависимость активного транспорта ионов в жабрах, чем их диффузионных потерь. Следует отметить, что динамика изменения электролитов в крови при резком (шоковом) изменении температуры по величине отклонения и сроками стабилизации содержания ионов в тканях сходна с теми же закономерностями, которые отмечены при стрессе, вызванном хендлингом (Reaves et al., 1968).

Для стандартизации исследований на рыбах в полевых и лабораторных условиях можно рекомендовать в период, непосредственно предшествующий экспериментам, периодически подвергать рыб хендлингу, смене ионного состава и температуры, если это предстоит в эксперименте, специально, осуществляя, таким образом, своеобразную "дрессуру", что укорачивает время восстановительного периода и гарантирует ослабление эффекта стресса во время последующих опытов.

При работе со stenotherмными видами рыб следует учитывать, что незначительные, но внезапные уменьшения температуры могут вызвать стрессовое состояние и связанное с ним нарушение ионной регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

- Богоявленская М.П. Возможность использования Ca^{45} в качестве метки рыб // Рыб. хозяйство, 1955. 11, 50-51.
- Виноградов Г.А. Адаптация водных животных с различными типами осморегуляции к понижению рН внешней среды // Физиол. и паразитол. пресновод. животн. Л.: Наука. 1979, 17-25.
- Виноградов Г.А., Клерман А.К. Ионный обмен пресноводных рыб при стрессе // Вопр. ихтиол. 1987. 27, 307-312.
- Виноградов Г.А., Комов В.Т. Ионный обмен у карася *Carassius carassius* L. и карпа *Cyprinus carpio* L. при акклимации к воде низкой минерализации // Вопр. ихтиол. 1988. 28, 124-132.
- Виноградов Г.А., Комов В.Т. Обмен катионов у карася *Perca fluviatilis* L. (Percidae) в средах с различным ионным составом. // Физиологический журн. им.И.М.Сеченова. 1987. LXXIII, 986-989.
- Виноградов Г.А., Комов В.Т., Матей В.Е., Даль Е.С. Влияние полхлорпина на обмен натрия, ультраструктуру жабр и ферментативную активность в тканях у карася. // Пресноводные гидробионты и их биология. Труды Ин-та биол. внутр. вод. Наука 1983. 48(51), 207-214.
- Генецинский А.Г. Физиологические механизмы водно-солевого равновесия // М.-Л.: Наука. 1964, 427 с.
- Евтушенко Н.Ю., Борисюк А.Б. Биосинтетическая направленность обменных процессов в печени карпа *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) в зависимости от концентрации магния в воде // Вопр. ихтиол. 1985. 25, 328-332.
- Кирпичников В.С., Световидов А.Н., Трошин А.С. Поглощение и отдача радиоактивного кальция дафниями, циклопами и гуппиями // ДАН СССР 1956. 110, 1122-1125.
- Лаврова Е.А., Штерман Л.Я., Наточин Ю.В. Накопление ионов из воды различной минерализации и их потери в среду радужной форелью // Вопр. ихтиол. 1976. 19, 148-154.
- Матей В.Е. Хлоридные клетки - структурная основа ионообменных процессов в жабрах костистых рыб // Цитология 1986. 28, 5-22.
- Наточин Ю.В., Лаврова Е.А. Физиологические механизмы водно-солевого гомеостаза у рыб различной экологии // Биологические основы рыбоводства М. Наука. 1984. 133-166.

- Пора А.Е., Прекуп О. Об изучении экскреторных процессов у пресноводных рыб. Сообщ. 1. Влияние температуры среды на выделительные процессы у карпа и карася // *Вопр. ихтиол.* 1960. 15, 138-147.
- Проссер Л. Сравнительная физиология животных // М.: Мир. 1977. 1, 606 с.
- Смит Л.С. Введение в физиологию рыб. Агропромиздат. 1986, 168 с.
- Турстон Р.В., Виноградов Г.А., Комов В.Т., Матей В.Е. Влияние низких значений рН, солей аммония и обессоливания на активность ферментов, обмен натрия в жабрах и ультраструктуру хлоридных клеток у пресноводных рыб. Сообщение 1. // *Информ бюлл.: Биология внутренних вод*, Л.: Наука. 1979. 43, 75-81.
- Шеханова И.А. О возможности усвоения рыбами неорганического фосфора из воды // *ДАН СССР*. 1955. 106, 161-165.
- Carrier J.C., Evans D.H. The role of environmental calcium in the freshwater survival of the marine teleost // *J. Exp. Biol.*, 1976. 65. 529-538.
- Eddy F.B. Effects of stress in ionic regulation in fish. // *Stress in Fish*. London, Academic Press, 1981. 77-102.
- Evans D.H. Sodium, chloride and water balance of the intestinal teleost, *Xiphister atropurpureus* // *J. Exp. Biol.* 1967. 3, 519-534.
- Evans D.H. Sodium, chloride and water balance of the intestinal teleost, *Pholis gunnelus* // *J. Exp. Biol.* 1969. 50, 179-190.
- Evans D.H. Ionic exchange mechanisms in fish gills // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1975. 51A, 491-495.
- Evans D.H. Fish // *Osmotic and ionic regulation in Animals*. Academic Press. London. 1979. 1, 305-390.
- Heisler N. Transepithelial ion transfer processes as mechanisms for fish acid-base regulation in hypercapnia and lacticidosis // *Can. J. Zool.* 1982. 60, 1108-1122.
- Kerstetter T.H., Kirschner L.B. Active chloride transport by the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *J. Exp. Biol.* 1972. 56, 263-272.
- Kerstetter I.H., Kirschner L., Rafuse D. On the mechanisms of Na^+ ion transport by the irrigated gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *J. Gen. Physiol.* 1970. 56, 342-359.
- Kirschner L.B. External charged layer and Na^+ regulation // *Alfred Benzon Symposium. XI. Osmotic and Volume regulation*. Acad. Press. N.Y. 1978, 310-321.
- Krogh A. Osmotic regulation in aquatic animals. Cambridge. 1939, 3-242.
- Krogh A. Osmotic regulation in freshwater fishes by active absorption of chloride ions // *Z. Vergl. Physiol.* 1937. 24, 656-666.
- Maetz J. Fish gills: mechanisms of salt transfer in freshwater and sea water // *Phil. Trans. R. Soc. London*, 1971. 262, 209-251.

- Maetz J., Garsia Romeu F.* The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of a freshwater fish *Carassius auratus*. II Evidence for $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ and $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ exchanges // *J. Gen. Physiol.* 1964. 47, 1209-1227.
- Maetz J.* $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, Na^+/H^+ -exchanges and NH_3 movement across the gill of *Carassius auratus* // *J. Exp. Biol.* 1973. 58, 255-275.
- Mc Donald D.G., Wood C.M.* Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH // *J. Exp. Biol.* 1981. 93, 101-118.
- Payan P.* A study of the $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange across the gill of the perfused head of the trout (*Salmo gairdneri*) // *J. Comp. Physiol.* 1978. B124, 181-188.
- Potts W.I.W., Fleming W.* The effect of prolactin and divalent ions on the permeability to water of the *Fundulus kansae* // *J. Exp. Biol.* 1970. 53, 317-327.
- Reawes R.S., Kouston A.H., Madden J.A.* Environmental temperature and the body fluid system of the freshwater teleost. Ionic regulation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, following abrupt thermal shock. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1968. 25, 849-860.
- Smith H.W.* The absorption and excretion of water and salt by marine teleost // *Amer. J. Physiol.* 1930. 93, 480-505.

ПРИРОДНЫЙ БАЛАНС КАТИОНОВ В ВОДЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ЕГО НАРУШЕНИЯ

**Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН.
Петрозаводск**

Антропогенные воздействия часто служат причиной серьезных нарушений метаболизма гидробионтов, что может приводить к нарушениям их развития или гибели. Примером таких воздействий могут служить техногенные воды железорудного горнообогатительного комбината (ГОК) г. Костомукши, которые отличаются аномальным соотношением щелочных и щелочноземельных металлов, обусловленным высоким содержанием калия (130-140 мг/л). Поступление их в р. Кентя в результате периодических сбросов, а также в виде фильтрационных вод, просачивающихся через заградительную дамбу, вносит в природные водоемы, расположенные ниже по течению, дисбаланс ионов (увеличение содержания калия), изменяя среду обитания гидробионтов.

Исследования, проведенные в районе влияния фильтрационных вод хвостохранилища, показали изменения липидного обмена некоторых представителей зообентоса (Регеранд, 1995), которые могут являться косвенной причиной изменения структурной и функциональной организации зообентических сообществ. Хотя нельзя отрицать воздействие на жизнедеятельность организмов изменения других абиотических и биотических факторов, влияние минеральной нагрузки в данном случае остается преобладающим.

Ряд лабораторных экспериментов, проведенных на зоопланктонных организмах, представителях озерно-речной системы исследуемого региона, показали негативное воздействие сточной воды хвостохранилища на их выживаемость (Дубровина и др. 1995; Регеранд, Дубровина, 1995). Выяснилось, что при добавлении солей натрия и кальция и изменении, тем самым, соотношения катионов в воде, процент выживаемости опытных организмов увеличивается, при этом показатели липидного обмена достоверно не отклоняются по сравнению с контрольными организмами.

Очевидно, что изменение среды обитания гидробионтов отра-

жается и на клеточном уровне. на биохимических процессах и, в частности, липидном обмене. При этом важное значение в процессах адаптации имеют липиды мембран, возможные изменения в составе которых могут помочь организму выжить, в частности, за счет создания надлежащей локальной мембранной микросреды для работы ферментов (Хочачко, Сомеро, 1977, Бергельсон, 1982). Влияние стоков ГОКа было отмечено и на личинках сига и форели, которое выражалась в изменении классов липидов, а также в различных количественных сдвигах одних и тех же показателей липидного обмена при одинаковых концентрациях токсикантов (Богдан и др., 1993).

Целью работы было выяснение влияния сточных вод хвостохранилища Костомукшского ГОКа на липидный состав икры рыб с возможной прогностической оценкой последствий для развития гидробионтов в зоне распространения загрязнения.

Материалы и методы

Икру ряпушки *Coregonus albula* L. получали на Петрозаводской акклиматизационной станции после оплодотворения. Для приготовления опытных растворов использовалась вода из хвостохранилища, а в качестве контроля - водопроводная вода. Опыт был поставлен по схеме с учетом соотношения основных катионов (табл. 1).

Таблица 1

Схема токсикологического эксперимента

Показатели	Контроль (1)	Опыт (2)	Опыт (3)
$\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} / \text{Na}^{+} + \text{K}^{+}$	3.9	0.5	0.80
Выживаемость на 14 сутки	100%	96.6%	98.3%
Выживаемость на 30 сутки	100%	71.4%	81.7%

Икра опытной группы 2 находилась в сточной воде, взятой непосредственно из хвостохранилища. Среда, используемая в опытной группе 3, была создана экспериментально при добавлении солей натрия (NaCl) и кальция (CaCl_2) в сточную воду до изменения соотношения катионов, указанного в табл. 1. Смену растворов во всех группах проводили через сутки. В каждой группе находилось по 350 икринок (5

повторностей по 70 экземпляров). Продолжительность эксперимента 30 суток. Наблюдения за развитием икры велись от стадии “прозрачный зародыш, отсутствие пигмента и хвостового отдела” до стадии “формирование системы кровообращения и пульсация сердца”

Для приготовления одной пробы липидного экстракта икру из каждой экспериментальной группы фиксировали смесью хлороформ-метанола (2:1, по объему) в отдельной емкости по методу Фолча (по 6 проб из каждой группы) (Folch et al., 1947). Количественное определение содержания липидных фракций проводили спектрофотометрическими методами (Лизенко, 1980) после разделения их на тонкослойных пластинках (каждую пробу в двух параллелях). Биохимический анализ включал определение содержания суммарных липидов (СЛ) в организме прудовиков, отдельных липидных фракций (фосфолипидов - ФЛ, триацилглицеринов - ТАГ, холестерина - ХС, эфиров холестерина - ЭХС), индивидуальных фосфолипидных компонентов (лизофосфолипидов - ЛФЛ, сфингомиелина СФМ, фосфатидилхолина - ФТХ, фосфатидилэтаноламина - ФЭА, фосфатидной кислоты - ФК).

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методам (Ивантер, Коросов, 1992). Для оценки различий между опытными и контрольной группами применяли критерий Стьюдента (уровень значимости приняли как $P < 0.05$).

Результаты и обсуждение

В течение 13 дней развитие икры во всех группах проходило одинаково. На 14 сутки в период завершения пигментации глаз и образования хвостового отдела началась гибель зародышей. В растворе 2 она составляла 3,43%, а в растворе 3 – 1,71% (табл. 1). В контроле гибель не обнаружена. У погибших зародышей наблюдались патологические отклонения, выражающиеся в потемнении и разрыхлении оболочки икры, приводящие к ее разрыву. К концу эксперимента оставшиеся в живых эмбрионы были подвижны с полной пигментацией глаз и туловища, а также развитым кровообращением. На этот период показатель выживаемости эмбрионов в опытных растворах снизился (табл. 1). Наблюдаемые внешние физиологические и морфологические изменения наружной оболочки икры погибших зародышей послужили ос-

новной для предположения о возможном нарушении липидного статуса мембран. Следовательно, основной гипотезой биохимического исследования было предположение об изменении физических качеств мембраны, в частности, ее проницаемости, вследствие перестройки химического состава и пространственной организации липидов, формирующих данную структуру. При этом способность сохранять оптимальный размах этих изменений в ответ на воздействие окружающей среды явилось одним из факторов устойчивости мембран икры и выживания определенного процента зародышей.

Установлено, что основными липидными компонентами икры ряпушки являются ФЛ, составляя во всех группах более 50% от общего содержания липидов. Концентрация ТАГ и, особенно, ХС и его эфиров значительно ниже (табл. 2).

Таблица 2.

Содержание липидов в икре ряпушки

Показатели	Контроль (1)	Опыт (2)	Опыт (3)
% от суммы			
Фосфолипиды	76,95±2,1	86,72±2,5	66,83±3,1
Триацилглицерины	13,27±0,9	2,44±0,3	20,40±1,1
Холестерин	5,03±0,6	5,77±0,4	7,44±0,8
Эфиры холестерина	4,76±0,4	5,06±0,3	7,15±0,4
% сухого веса			
Суммарные липиды	7,48±0,6	4,99±0,3	12,24±1,1
Фосфолипиды	5,76±0,8	4,33±0,3	8,18±0,9
Триацилглицерины	0,99±0,1	0,12±0,04	2,50±0,4
Холестерин	0,38±0,1	0,29±0,05	0,91±0,1
Эфиры холестерина	0,38±0,08	0,25±0,07	0,88±0,1

Как известно, ТАГ представляют одну из форм запасных липидов, обеспечивающих энергетику развивающегося организма. Значительные отклонения содержания ТАГ в икре от контрольных показателей могут расцениваться как невосполнимое нарушение процессов, связанных с ростом зародышей. Роль ТАГ особенно важна в развивающейся икре со своей спецификой на каждом этапе (Сидоров и др., 1996). Содержание ХС и его эфиров в икре ряпушки составляло около

10% в контроле от суммы общих липидов. С точки зрения биохимического исследования причин морфологических нарушений оболочки икры в эксперименте большое значение имеет изменение концентрации ХС, как одного из основных компонентов мембран, и ЭХС, как возможного резервного его источника. Таким образом, изменение содержания фосфолипидной и холестериновой фракций могут свидетельствовать о нарушениях мембран наружной оболочки икры и построении клеток развивающегося организма, а фракций триацилглицеринов и эфиров холестерина - о дисбалансе энергетического обеспечения организма.

Обнаружено увеличение содержания ФЛ в икре опытной группы 2 на 12,7% по сравнению с контролем при значительном, в 5 раз, снижении ТАГ (табл. 2). Предположительно это связано с активацией синтеза ФЛ, направленного на укрепление оболочек икры. Однако, фракционный анализ ФЛ показал, что если этот процесс и идет, то с явным нарушением, так как доля лизофосфолипидных соединений в икре 2 группы возросла в 2,6 раза по сравнению с контролем, что, в свою очередь, приводит к дестабилизации мембраны (табл. 3). Более

Таблица 3

Содержание фосфолипидов в икре ряпушки

Показатели	Контроль (1)	Опыт (2)	Опыт (3)
% от суммы фосфолипидов			
Лизофосфолипиды	3,27±0,3	8,51±0,4	4,91±0,4
Сфингомиелин	14,42±1,5	19,72±1,1	10,97±1,4
Фосфатидилхолин	69,79±1,0	52,58±2,1	64,33±2,3
Фосфатидилэтаноламин	10,81±0,6	14,64±1,2	17,99±2,0
Фосфатидная кислота	1,72±0,2	4,54±0,9	2,08±0,4
в % от сухого веса фосфолипидов			
Фосфолипиды	5,76±0,8	4,33±0,3	8,18±0,9
Лизофосфолипиды	0,19±0,02	0,37±0,05	0,40±0,04
Сфингомиелин	0,83±0,06	0,85±0,05	0,90±0,06
Фосфатидилхолин	4,02±0,11	2,28±0,20	5,26±0,16
Фосфатидилэтаноламин	0,62±0,05	0,63±0,05	1,47±0,17
Фосфатидная кислота	0,10±0,02	0,20±0,06	0,17±0,03

наглядно это видно при увеличении коэффициента отношения ЛФЛ фракции к ФТХ - основному фосфолипидному компоненту мембран (табл. 4).

При добавлении солей натрия и кальция в сточную воду наблюдается обратное явление - торможение синтеза ФЛ, содержание которых падает на 13% относительно контроля, а доля ТГ увеличивается при этом 1,5 раза. При этом концентрации индивидуальных фосфолипидов, рассчитанные в процентах к их общему содержанию, остаются близкими к контролю, также как и соотношения отдельных компонентов между собой (табл. 4). Одной из причин снижения смертности зародышей этой группы, по сравнению с группой 2, может быть увеличение в 1,3 раза содержания ХС, признанного уплотнителя мембран. Содержание индивидуальных фосфолипидов, рассчитанное в процентом отношении, близко к контролю, также как и их соотношения (табл. 4).

Таблица 4

Соотношение различных липидных фракций в икре ряпушки

Показатели	Контроль (1)	Опыт (2)	Опыт (3)
Общие липиды/фосфолипиды	1,3	1,1	1,5
Общие липиды/триацилглицерины	7,6	42,6	4,9
Общие липиды/холестерин	19,7	17,2	13,4
фосфолипиды+холестерин/триацилглицерины+эфиры холестерина	4,5	12,5	2,7
лизосомальные липиды/фосфатидилхолин	0,05	0,16	0,08
сфингомиелин/фосфатидилхолин	0,21	0,38	0,17

Изменение относительной доли липидных компонентов не является окончательной результирующей ответной реакцией организма на воздействие со стороны окружающей среды. Более плодотворной она может быть только в случае усиления синтеза липидов в целом.

Показано, что изменение минерализации воды, в данном случае в результате влияния сточной воды с повышенной концентрацией калия, вызывает снижение содержания общих липидов, рассчитанных в процентах сухого веса, в 1,5 раза по сравнению с контролем. Дополнительное введение солей натрия и кальция в сточную воду, наоборот,

приводит к значительному росту липидной компоненты икры, как относительно контроля (в 1,6 раза), так и опытной группы 2 (в 2,6 раза). Это дает возможность увеличить количество ФЛ почти в 2 раза по сравнению с группой 2 и, соответственно, повысить величину показателя отношения содержания общих липидов к ФЛ (табл. 4). Подобная адаптационная реакция - активация синтеза липидов - наблюдалась нами и ранее при изучении влияния различных токсикантов (Регеранд и др., 1995; Регеранд и др., 1996). В результате этого некоторые процессы, имеющие положительную направленность в абсолютном значении, при рассмотрении их с точки зрения торможения или активации общего синтеза липидов приобретают противоположное значение. Таким образом, абсолютное увеличение фосфолипидной компоненты в икре опытной группы 2 при ингибировании синтеза липидов в целом не приводит к улучшению ситуации. Дополнительно к этому, указанный ранее рост лизофосфолипидной фракции свидетельствует скорее всего о нарастающем гидролизе ФЛ. Разрушение ФЛ слоя мембраны при сопутствующем снижении доли ХС (табл. 4) вполне может реализоваться в виде разрыва оболочки икры и гибели эмбрионов. Наоборот, введение солей натрия и кальция способствуют улучшению биологического качества воды, препятствуя разрушению мембран за счет увеличения содержания ФЛ и ХС на фоне активации общего синтеза липидов. Известно, что присутствие кальция во внешней среде уменьшает проницаемость клеточных мембран и стабилизирует межклеточные контакты (Виноградов, 1984).

Пресноводные организмы постоянно поддерживают во внутренней среде осмотическое давление, концентрацию минеральных веществ и рН на уровнях, значительно отличающихся от окружающей их среды. Установлено, что водно-солевой обмен и процессы кислотно-щелочной регуляции моллюсков, ракообразных и рыб обладают высокой чувствительностью к изменению различных параметров внешней среды (Виноградов, 1990). Важной особенностью ионного обмена этих гидробионтов является способность регулировать уровень общей концентрации солей, при этом особая роль отводится регуляции жаберного эпителия у пресноводных костных рыб в результате качественных преобразований межклеточных соединений (Виноградов, 1987).

Таким образом, на первое место среди основных морфологиче-

ских адаптационных приемов, позволяющих водным животным переносить значительные изменения солевого баланса во внешней среде, выходят регулирование проницаемости покровных тканей для ионов и высокая устойчивость межклеточных соединений этих тканей к изменению концентрации растворенных солей, в том числе и при ее увеличении. Это обеспечивается за счет функционирования мембранных структур клеток и тканей, образованных в основном липидами (ФЛ и ХС). Кроме того, в липидном матриксе мембран локализованы ферменты, на активность которых мембрана непосредственно влияет.

Повышенная минерализация воды создает условия для организма, когда необходимо укрепить мембранный барьер так, чтобы воспрепятствовать проникновению не нужных ионов растворенных солей в клетки как по пассивному пути или в виде ионной диффузии, так и по активному ионно-обменному механизму за счет ферментов-переносчиков. На этом фоне высокая концентрация калия в воде в эксперименте непосредственно затрагивает функционирование $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФазной системы. В частности, есть сведения, что поскольку этот фермент локализован на поверхности мембран и, возможно, является их структурным компонентом, его активность зависит от наличия фосфолипидов (Хочачко. Сомеро, 1977). Таким образом, наши исследования могут косвенно свидетельствовать о возможных нарушениях, связанных с ферментативными реакциями, процессами переноса веществ через мембрану и развитием дальнейших патологий, основанных на дисбалансе соотношения липидных компонентов.

Проведенный эксперимент показал, что изменение соотношения катионов в воде, в частности за счет повышенного содержания калия, может быть причиной сложного и опасного экологического воздействия на развивающуюся икру рыб и кроме физиологических нарушений вызывать тонкие дисбалансы на клеточном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

- Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки. М., 1982, 180 с.
Богдан В.В., Нефедова З.А., Маркова Л.В. Изменение липидного и жирнокислотного состава личинок сига и форели при действии стоков горно-обогатительного комбината // Вестн. Днепропетровского ун-та. Биология и экология. 1993. Вып. 1, 188

- Виноградов Г.А., Комов В.Т., Матей В.Е.* Функциональные основы действия низких pH на рыб и ракообразных // Физиологические и биохимические аспекты токсикологии пресноводных животных ИЕВВ АН СССР. 1984. Деп. в ВИНТИ 23.03.1984. № 1637-84 деп.
- Виноградов Г.А., Клерман А.К.* Ионный обмен у пресноводных рыб при стрессе // Вопр. ихтиол. 1987. 27, Вып. 2.
- Виноградов Г.А.* Процессы ионной регуляции у пресноводных рыб и беспозвоночных // Физиология, биохимия и токсикология пресноводных животных. Л.: 1990, 3-28.
- Дубровина Л.В., Калинин Н.М., Лозовик П.А.* Факторы токсичности для гидробионтов техногенных вод Костомукшского ГОКа // Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: ИВПС КНЦ РАН. 1995, 15-25.
- Ивантер Э.В., Коросов А.В.* Основы биометрии. Петрозаводск. ПГУ. 1992, 165 с.
- Лизенко Е.И.* Методы выделения и количественного определения липидов // Вопр. теорет. и клин. иммунологии. Петрозаводск: ПГУ. 1980, 71-85.
- Регеранд Т.И.* Изменение липидного обмена некоторых представителей зообентоса р. Кенти под влиянием фильтрационных вод // Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: ИВПС КНЦ РАН. 1995, 25-33.
- Регеранд Т.И., Дубровина Л.В.* Изменение некоторых биохимических параметров липидного обмена прудовиков при нарушении в воде соотношения катионов // Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на водоемы системы реки Кенти. Петрозаводск: ИВПС КНЦ РАН. 1995, 34-43.
- Регеранд Т.И., Федорова Н.В., Лизенко Е.И., Михайлова Н.В.* Влияние ионов никеля на липиды и жирные кислоты фосфолипидов икры сига в нейтральной среде и при ее закислении // Онтогенез. 1996. 27, 208-213.
- Сидоров В.С., Нефедова З.А., Юровицкий Ю.Г.* Динамика фракционного состава липидов в желтке и жировых каплях в онтогенезе лосося // Онтогенез. 1996. 27, 200-203.
- Хочачко П., Сомеро Дж.* Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир 1977, 398 с.
- Folch J., Lees M., Stoane-Stanley G.H.* A simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissues // J. Biol. Chem. 1947 1, 497-509.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗУ-А₄ ВЬЮНА ПРИ
ТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИИ.**

Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН, Москва

Изменение температуры среды оказывает существенное воздействие на различные стороны метаболизма пойкилотермных животных, в том числе на характер экспрессии генов и белков, а также на активность большинства ферментов (Александров, 1975, Хочачка, Сомеро, 1988, Озернюк, 2000). Филогенетические (генотипические) адаптации рыб к различным температурам обитания сопровождаются аминокислотными заменами, которые влияют на стабильность (гибкость) молекул некоторых ферментов (Holland et al., 1997; Fields, Somero, 1998). Температура обитания оказывает влияние и на уровень экспрессии ферментов. В частности, ранее были показаны различия в уровне экспрессии лактатдегидрогеназы-В (ЛДГ-В) у фундулюса *Fundulus heteroclitus* из северных и южных широт (Segal, Crawford, 1994). Сравнительный анализ промоторных участков гена ЛДГ-В у рыб из северных и южных широт выявил в них структурные отличия (Segal et al., 1996).

При изучении влияния кратковременных температурных адаптаций (акклимаций) на экспрессию белков наиболее впечатляющие результаты были получены для ферментов рыб: ацетилхолинэстеразы из мозга радужной форели *Salmo gairdneri* (Baldwin, Hochachka, 1970) и эстераз из печени и тканей глаза зеленого солнечника *Lepomis cyanellus* (Shaklee et al., 1977). При акклимации к низким и высоким температурам изоферментные спектры этих ферментов отличаются. Однако изоферментные спектры других ферментов не меняются при температурной акклимации рыб (Shaklee et al., 1977).

Следует отметить, что молекулярные механизмы температурных акклимаций изучены недостаточно. Известно, в частности, что при температурной акклимации вьюна меняются кинетические и структурные (термостабильность, устойчивость к денатурирующему действию мочевины, спектры белковой флуоресценции) свойства лак-

татдегидрогеназы-А₄ (ЛДГ-А₄) из белых скелетных мышц, тогда как электрофоретические спектры фермента в этих опытах не менялись (Ozemyuk et al., 1994). Эти различия могут свидетельствовать об определенных конформационных отличиях фермента, синтезированного в мышцах рыб при низких и высоких температурах акклимации.

Для выяснения механизмов, определяющих различия свойств ЛДГ при акклимации к низким и высоким температурам, был проведен анализ экспрессии гена, кодирующего этот фермент в белых скелетных мышцах вьюна.

Материалы и методы

Работу проводили на взрослых половозрелых вьюнах *Misgurnus fossilis*. Рыбы были акклимированы к низким (5°C) и относительно высоким (18°C) температурам в течение 20 суток. Тотальную РНК выделяли из белых мышц вьюнов с помощью гуанидинтиоцианатного метода (RNazolB, Cinna/Biotech, Friendswood, TX) (Puissant, Houdebine, 1991). Фракцию мРНК получали из тотальной РНК с помощью готового набора (Dynabeads mRNA purified kit, Dynal, Oslo) кДНК были получены на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы (SuperScript) и использовались в полимеразной цепной реакции для получения фрагментов, несущих информацию о структуре гена ЛДГ-А вьюна. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, используя Taq-полимеразный протокол на амплификаторе (Omni Gene, Hybaid). 30 циклов амплификации проводили в следующих условиях: 94°C в течение 45 с, 56°C – 45 с, 72°C - 45 с и 72°C - 5 мин после последнего цикла. Для анализа ПЦР-продуктов использовали 1,5% агарозный гель в трис-ацетатном буфере. Элюцию ПЦР-фрагментов из агарозы проводили с помощью набора Geneclean (BIO 101, INC.). В качестве праймеров в ПЦР использовали синтезированные олигонуклеотиды:

первая пара 5'-GTGGACGTGATGGAGGATAAG-3' и
3'-CAGAAGGAGTCGCACGGAAG-5';

вторая пара 5'-TCGAGGAACAAGGTGACAGTGGT-3' и
3'-GACTTTGGGCTCCTCCTCTTCGT-5'.

Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили по методу терминальных аналогов Сэнджера (Sandger et al., 1977), используя набор DNA Sequencing kit Sequenase Version 2.0 (USB). Нозерн-гибриди-

зация мРНК для ЛДГ-А проводилась следующим образом. мРНК-5⁰С и мРНК-18⁰С фракционировали в 1,5% агарозно-формальдегидном геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр (Nitrان) и пришивали к нему в ультрафиолетовом излучении в условиях, рекомендуемых производителем [Schleicher, Schuell]. В качестве зонда при гибридизации использовали ПЦР-фрагменты, полученные на кДНК-5⁰С и кДНК-18⁰С, которые были мечены [α ³²P]dATФ (3000 мБк/мМ) с помощью метода рассеянной затравки (BRL kit). Специфическая активность зонда составляла 10⁸ имп/мин/мкг ДНК. Для проведения гибридизации использовали формальдегидную смесь [Quik Hyb mix, Stratagene]. Гибридизацию проводили при 68⁰С, а отмывку - при 60⁰С. Для конструирования праймеров и анализа первичной последовательности кДНК использовали компьютерную программу DNАstar и международный банк данных BLAST.

Результаты и обсуждение

Основой для исследования экспрессии гена/генов, кодирующих ЛДГ-А вьюна при акклимации к 5 и 18⁰С служили кДНК (кДНК-5⁰С и кДНК-18⁰С), синтезированные на матрице мРНК-5⁰С и мРНК-18⁰С с помощью обратной транскриптазы. Полученные кДНК использовались в полимеразной цепной реакции для получения фрагментов, несущих информацию о структуре гена ЛДГ вьюна.

На основании известных структур ЛДГ различных видов рыб, полученных из банка данных через Интернет, с помощью компьютерной программы DNA были сконструированы две пары праймеров, которые позволили получить ПЦР-фрагменты ЛДГ вьюна, на кДНК-5⁰С и кДНК-18⁰С. Размер этих фрагментов равен 700 пар оснований. Следует отметить, что, используя первую пару праймеров, были получены ПЦР-продукты (около 700 нуклеотидов) как на кДНК-5⁰С, так и на кДНК-18⁰С, в то время как со второй парой праймеров ПЦР-фрагменты (около 900 нуклеотидов) получены только на кДНК-18⁰С. Эти результаты позволили предположить, что в нуклеотидных последовательностях кДНК-5⁰С и кДНК-18⁰С могут быть отличия. Для проверки данного предположения был проведен анализ первичной структуры ПЦР-фрагментов, полученных на эти кДНК. Однако сравнение последовательностей ПЦР-фрагментов, полученных на кДНК-5⁰С и кДНК-18⁰С, не выявило различий в их структуре.

Было проведено сравнение степени гомологии последовательности полученных ПЦР-фрагментов со структурой гена ЛДГ-А. В табл. 1 приведены результаты сравнения нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов, соответствующих последовательностям гена ЛДГ-А вьюна, с генами ЛДГ-А некоторых рыб.

Таблица 1.
Сравнение гомологии нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов гена ЛДГ-А вьюна с генами ЛДГ-А других рыб.

		% гомологии				
% расхождения		1	2	3	4	
	1		78,2	77,5	77,8	1
	2	23,3		89,3	90,3	2
	3	22,9	9,7		96,5	3
	4	23,6	9,8	2,2		4
		1	2	3	4	

Прежде всего, следует отметить высокую степень гомологии этих последовательностей. Максимальная степень гомологии (96,5%) наблюдается с барракудой *Sphyarena idiastes*. Однако эти результаты следует рассматривать как предварительные, поскольку полная последовательность гена ЛДГ-А вьюна пока не установлена.

Для характеристики размеров мРНК ЛДГ-А из белых мышц вьюнов, адаптированных к низкой и относительно высокой температурам, были проведены эксперименты по Нозерн-гибридизации. Результаты этого анализа, приведенные на рис. 1, показали наличие различий: в мРНК-5⁰С выявлен один гибридационный сигнал (1400 нуклеотидов), а в мРНК-18⁰С – два сигнала (около 1600 и 1400 нуклеотидов). Таким образом, в мРНК-5⁰С и мРНК-18⁰С присутствует одна общая фракция мРНК для ЛДГ-А размером около 1400 нуклеотидов. Существование двух фракций в мРНК-18⁰С может указывать на наличие альтернативного сплайсинга.

Известно, что альтернативный сплайсинг широко распространен у многих генов и является мощным механизмом, дающим увеличение числа изоформ белка, кодируемого одним геном. Так, по последним данным 35% генов человека имеют альтернативный сплайсинг мРНК (Brett et al , 2000). Есть примеры наличия четырех и более

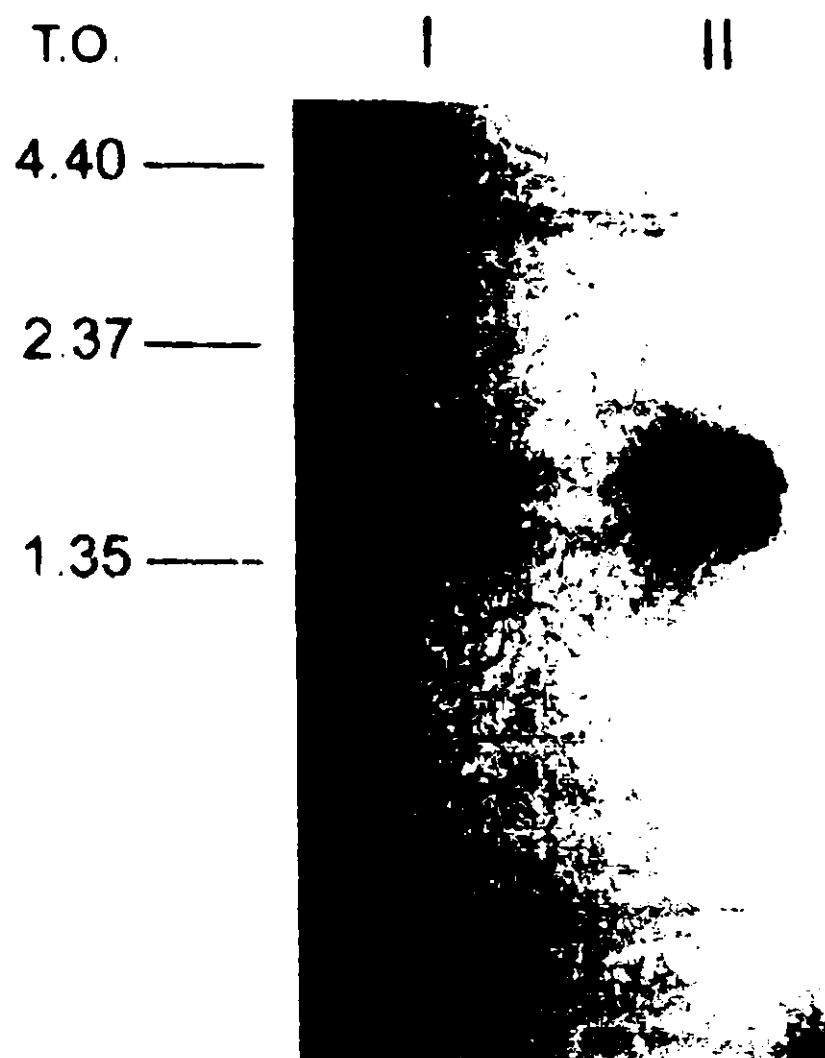


Рис 1 Радиоавтограф Нозерн-гибридизации мРНК-5°C (I) и мРНК-18°C (II), фракционированных в 1,5% агарозном геле, с меченым ^{32}P ПЦР-фрагментом, содержащим участок последовательности гена ЛДГ-А вьюна.

сплайс-вариантов некоторых мРНК (Danielson et al., 1994). Однако, функциональная роль альтернативного сплайсинга в экспрессии генов при температурной акклимации до настоящего времени не изучалась. Пока не вполне ясно, являются ли различия в размере мРНК для ЛДГ-А у вьюнов, адаптированных к разным температурам, результатом альтернативного сплайсинга, или результатом экспрессии родственных генов.

Полученные нами предварительные результаты демонстрируют наличие нового молекулярного механизма регуляции экспрессии гена, кодирующего мышечную форму ЛДГ-А в условиях температурной адаптации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проекты № 99-04-48213а, № 00-04-49060а

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В.А. Клетки, макромолекулы и температура Л Наука. 1975, 253с.
- Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М МГУ 2000, 205 с.
- Baldwin J., Hochachka P W Functional significance of isoenzymes in thermal

- acclimatization: acetylcholinesterase from trout brain // *Biochem. J.* 1970. 116, 883-887.
- Brett D., Lehmann J., Hanke S., Gross J., Reich P., Burk EST analysis online WWW tools for detection of SNPs and alternative splice forms // *Trends in Genetics*. 2000. 16, 369-422.
- Danielson P E., Forss-Petter S., Battenberg E.L.F., deLecea L., Bloom F.E. Four structurally distinct neuron-specific olfactomedin-related glycoproteins produced by differential promoter utilization and alternative mRNA splicing from a single gene // *J. of Neuroscience Res.* 1994. 38, 468-478.
- Fields P.A., Somero G.N. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic notothenioid fishes// *PNAS USA*. 1998. 98, 11476-11481.
- Holland L.Z., McFall-Ngai M., Somero G.N. Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of Barracuda fishes (Genus *Sphryaena*) from different thermal environments: differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site // *Biochemistry*. 1997. 36, 3206-3215.
- Ozernyuk N.D., Klyachko O.S., Polosukhina E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles // *Comp. Biochem. Physiol.* 1994. 107B, 141-145.
- Puissant L., Houdebine L. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction // *Biotechniques*. 1991. 8, 148-149.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *PNAS USA*. 1977. 74, 5463-5467.
- Segal J.A., Crawford D.L. LDH-B enzyme expression: the mechanisms of altered expression in acclimation and evolutionary adaptation // *Am. J. Physiol.* 1994. 267, 1150-1153.
- Segal J.A., Schulte P.M., Powers D.A., Crawford D.L. Descriptive and functional characterization of variation in the *Fundulus heteroclitus* Ldh-B proximal promoter // *J. Exp. Zool.* 1996. 275, 355-364.
- Shaklee J.B., Christiansen., Sidell B.D., Prosser C. L., Whitt G. S. Molecular aspect of temperature acclimation in fish: contribution of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish // *J. Exp. Zool.* 1977. 201, 1-20.

ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ТЕМПЕРАТУРНЫХ АДАПТАЦИЯХ РЫБ

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Известно, что кратковременная температурная адаптация (акклимация) пойкилотермных приводит к изменению свойств некоторых ферментов (Александров, 1975, 1985, Хочачка, Сомеро, 1988; Ozegnyuk et al., 1994; Озернюк, 2000). В частности, для лактатдегидрогеназы (М₄-ЛДГ) из мышц рыб, адаптированных к разным температурам в течение нескольких недель, были обнаружены различия некоторых кинетических параметров (Клячко и др., 1993, 1995; Ozegnyuk, 1994). Так, при адаптации вьюнов к 5°C («холодная» форма) и к 18°C («теплая» форма) положение минимума константы Михаэлиса (K_m) коррелировало с температурой среды. При этом различия в электрофоретической подвижности (Клячко и др., 1992) и в аминокислотном составе (Даниленко и др., 1998) этих форм фермента не найдены. Для решения вопроса о причинах этих различий было проведено комплексное исследование холодной и теплой форм ЛДГ с использованием метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК). Применение ДСК позволяет непосредственно измерить большинство интегральных термодинамических параметров денатурации белка, таких как изменение избыточной теплоемкости при денатурации - ΔC_p , температуру, соответствующую максимуму теплоемкости - T_m , энтальпию - ΔH и энтропию денатурации - ΔS , рассчитать изменение свободной энергии Гиббса - ΔG , а также количество независимо плавящихся участков в молекуле белка при денатурации - τ (Privalov, Khechinashvili, 1974, Privalov, 1979, 1986).

Определение теплоемкости нативной формы ЛДГ

Прежде всего была определена величина C_p для «холодной» и «теплой» форм ЛДГ при 25°C, которую рассчитывали из величин $\Delta C_{p, бел-раст}$, полученных экспериментальным путем. Следует отметить, что C_p не зависит от концентрации фермента (рис. 1). Было проведено сравнение величин C_p для двух форм ЛДГ. Для «холодной» формы

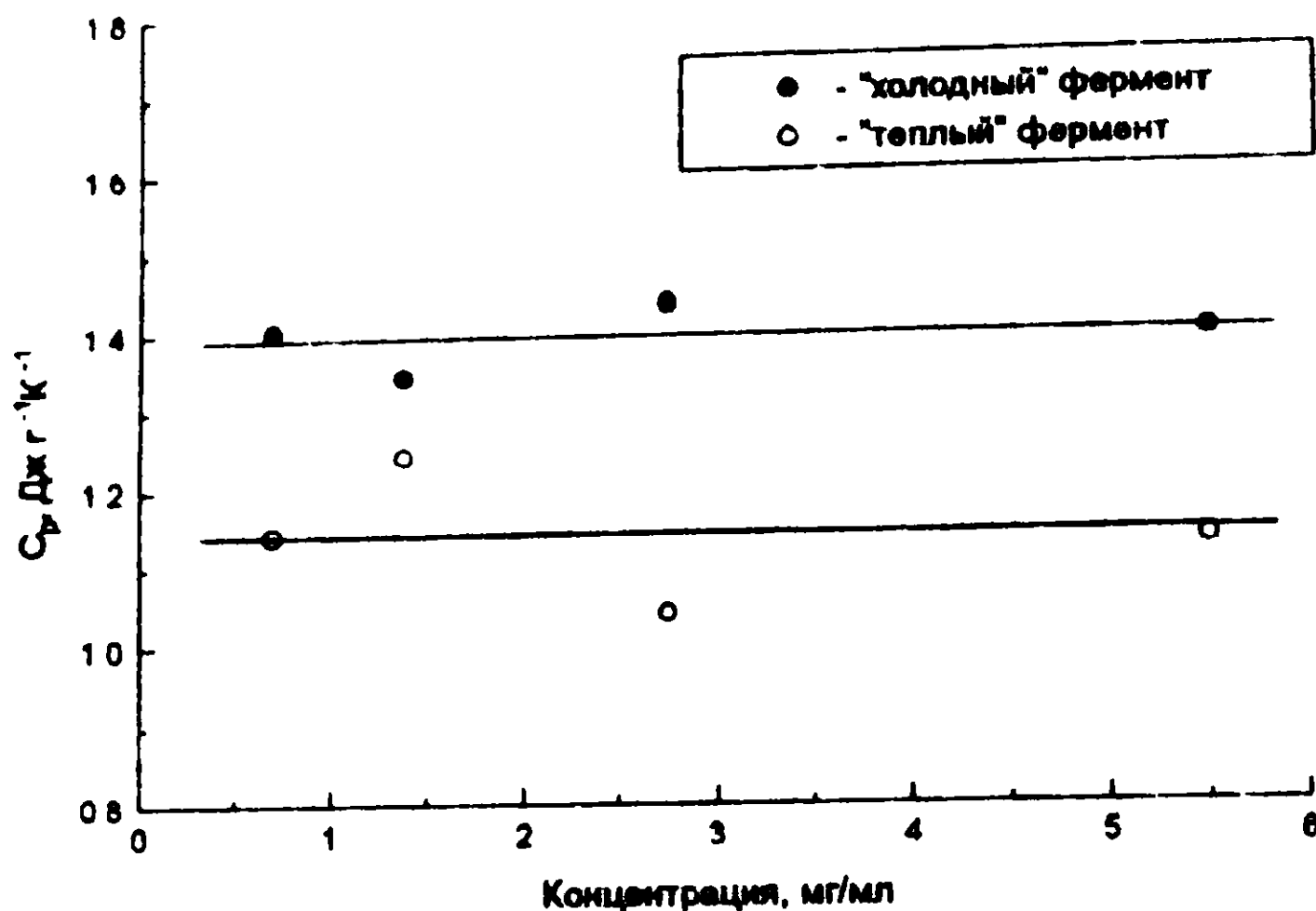


Рис. 1. Зависимость удельной теплоемкости нативной формы «холодной» и «теплой» ЛДГ от концентрации фермента при 25°C.

фермента эта величина равна $1,39 \pm 0,03$ Дж г⁻¹ К⁻¹, а для «теплой» формы – $1,14 \pm 0,05$, т. е. меньше на 20%. Теплоемкость нативной формы белка определяется вкладом трех составляющих: 1) теплоемкости полипептидной цепи и аминокислотных остатков (они равны для «холодной» и «теплой» формы ЛДГ, поскольку нет значимых различий их аминокислотного состава (Даниленко и др., 1998), 2) теплоемкости внутримолекулярных взаимодействий и 3) теплоемкости гидратной оболочки белковой молекулы (Privalov, Makhatadze, 1992). Полученные различия определяются, по-видимому, отличиями в теплоемкостях гидратации «холодной» и «теплой» форм ЛДГ. Различия величин C_p могут быть связаны, вероятно, с отличиями в поверхностных свойствах двух форм ЛДГ. Разница в теплоемкости этих форм означает, что «холодный» фермент при одинаковой температуре имеет большее теплосодержание, чем «теплый». Конформационная подвижность «холодной» формы становится достаточной для осуществления ферментативной реакции при меньших температурах среды, чем «теплой».

Термодинамические параметры денатурации ЛДГ при различных значениях pH раствора.

Характерные калориметрические кривые плавления «холодной» и «теплой» форм ЛДГ при разных pH показаны на рис. 2. Они содержат один достаточно узкий пик теплопоглощения, соответствующий фазовому переходу молекулы из нативной в денатурированную форму. При повышении pH с 6,5 до 8,5 пик смещается в область более низких температур.

Температура перехода белков из нативного в денатурированное состояние не отличается для «холодного» и «теплого» ферментов во всем диапазоне pH и достигает максимального значения в области pH 5,0-6,5 (рис. 3) Энтальпия денатурации при всех изученных значениях pH выше для «теплого» фермента и имеет максимум при pH 6,0 (рис. 4). Заметим, что при pH 4,0 удельная энтальпия денатурации уменьшается в два раза по сравнению с максимальным значением, а температура денатурационного перехода снижается на 10K. При pH 3,0 фазовый переход вообще не наблюдался, что говорит об отсут-

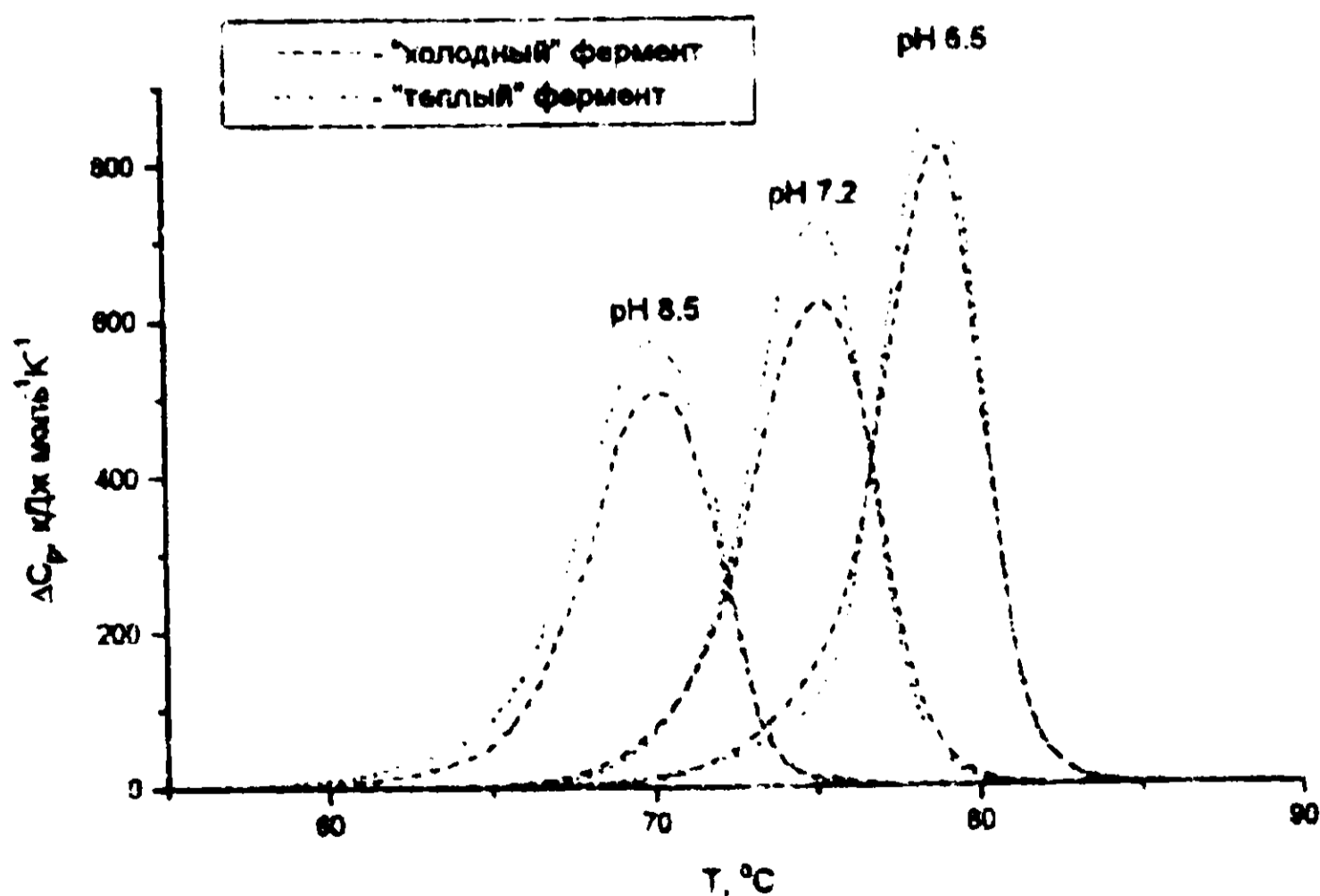


Рис. 2. Температурная зависимость избыточной теплоемкости «холодной» и «теплой» ЛДГ при pH 6,5, 7,2 и 8,5. Кривые произвольно смещены относительно оси ординат.

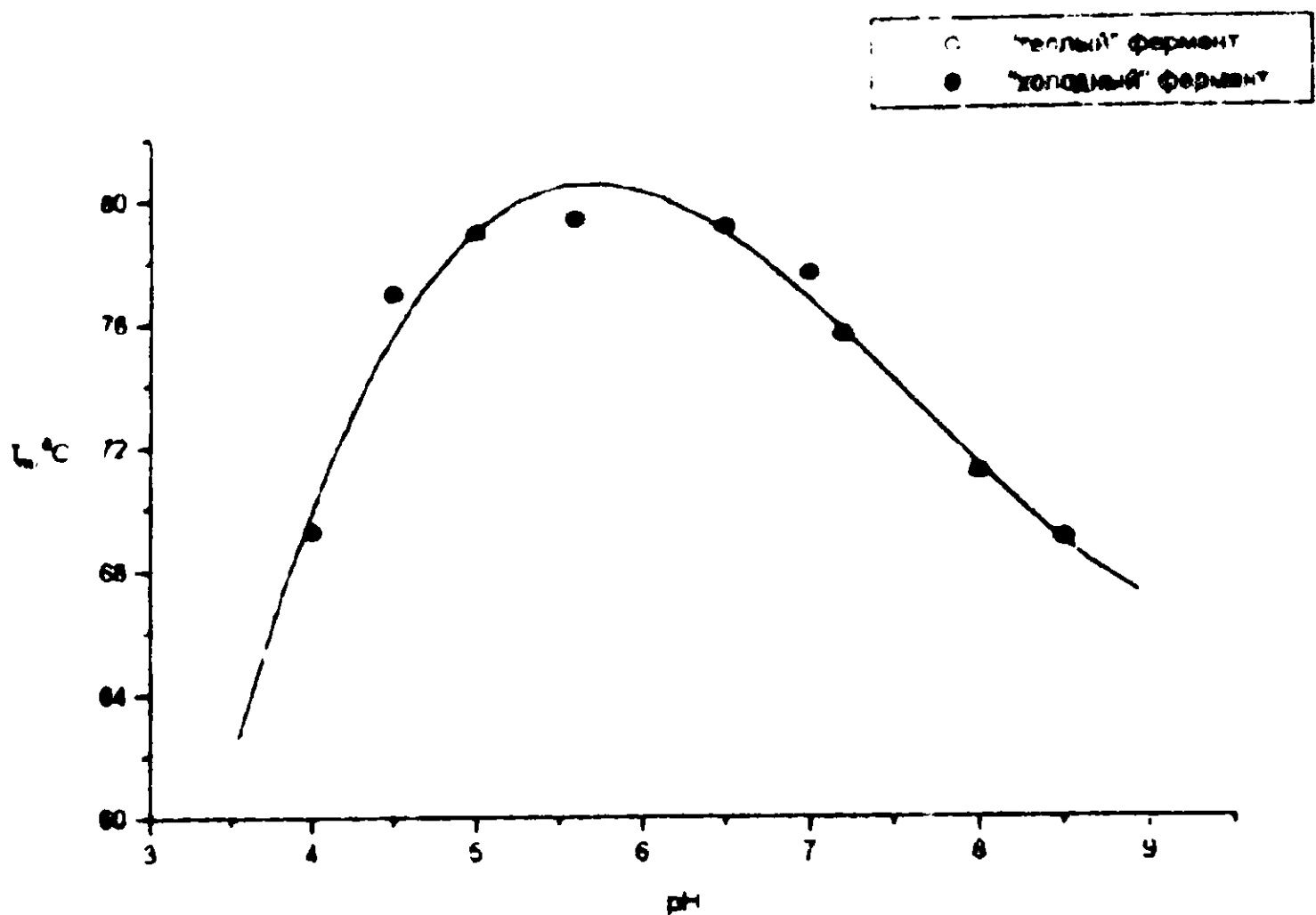


Рис. 3. Зависимость температуры денатурационного перехода «холодной» и «теплой» ЛДГ от pH раствора.

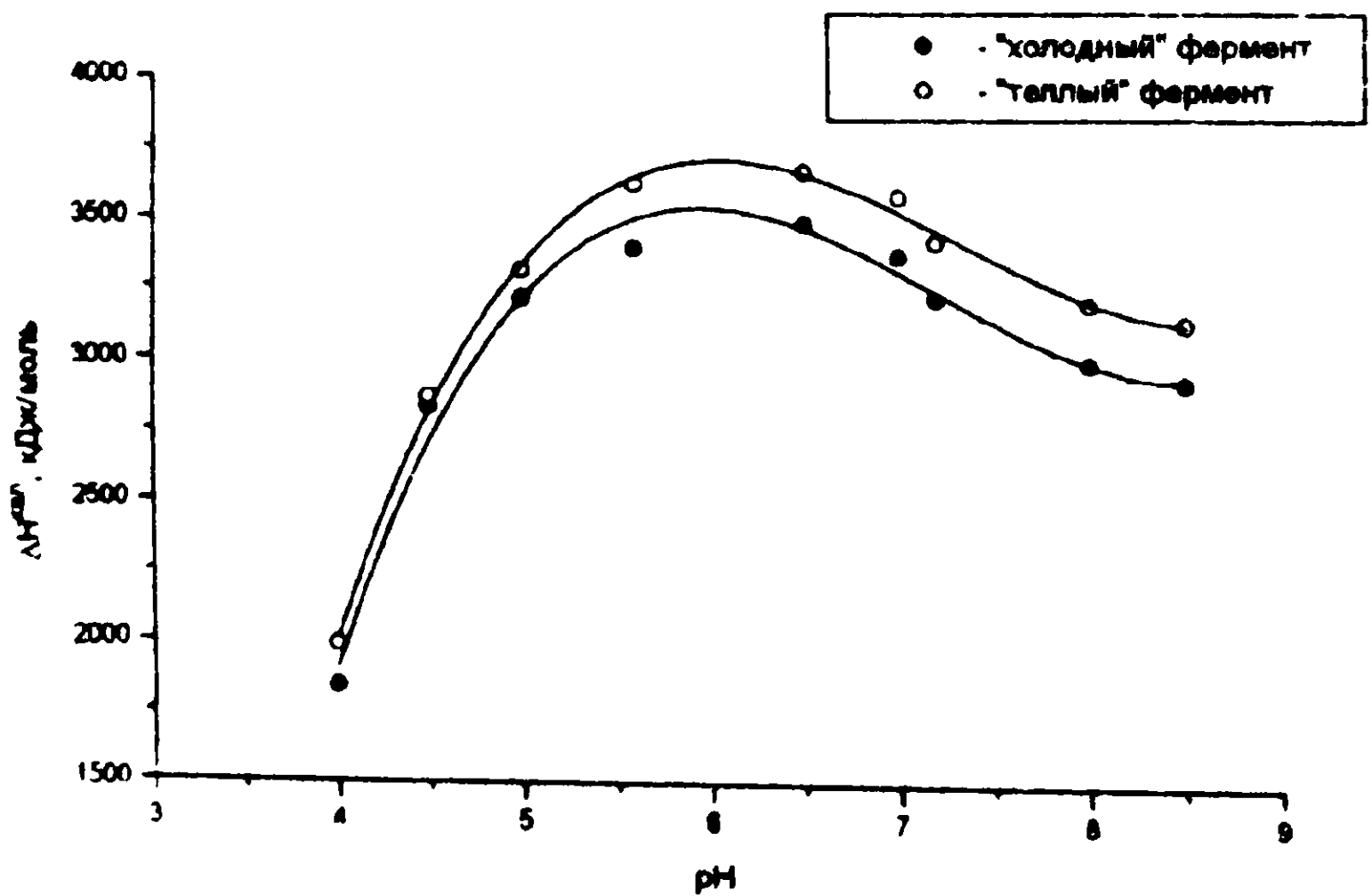


Рис. 4. Зависимость энтальпии денатурационного перехода «холодной» и «теплой» ЛДГ от pH раствора

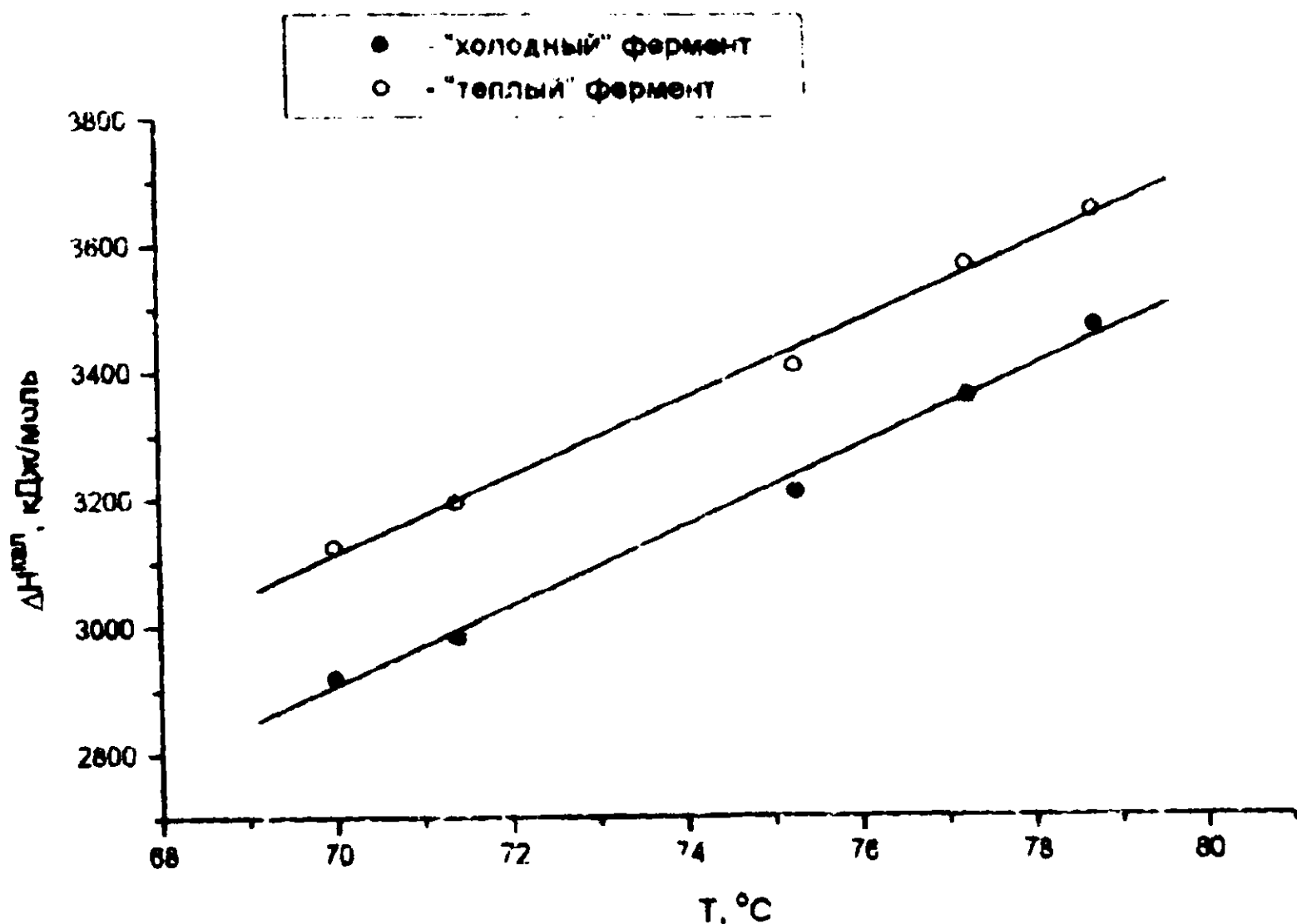


Рис. 5. Зависимость энтальпии денатурационного перехода «холодной» и «теплой» ЛДГ от температуры перехода.

вии нативной конформации молекулы уже при комнатной температуре. На рис. 5 представлены зависимости энтальпии денатурации от температуры перехода для «холодной» и «теплой» форм ЛДГ, которые аппроксимированы прямыми по методу наименьших квадратов. Тангенсы углов их наклона к оси абсцисс определяют исходя из формулы (4) разности теплоемкости между денатурированной и нативной формами белка ΔC_p , которые равны $0,45 \pm 0,02$ и $0,44 \pm 0,02$ Дж г⁻¹ К⁻¹ для «холодной» и «теплой» форм ЛДГ соответственно, т.е., практически совпадают.

На основании полученных данных была определена температурная зависимость свободной энергии Гиббса ΔG в расчете на одну субъединицу ЛДГ. Как видно из рис. 6, свободная энергия обеих форм фермента достигает максимального значения в области температур 300-310 К, что соответствует максимальной стабильности молекул ЛДГ. Следует отметить, что по данным, полученным нами ранее (Клячко и др., 1995), в этой же температурной области находится оптимум функциональной активности этих двух форм фермента.

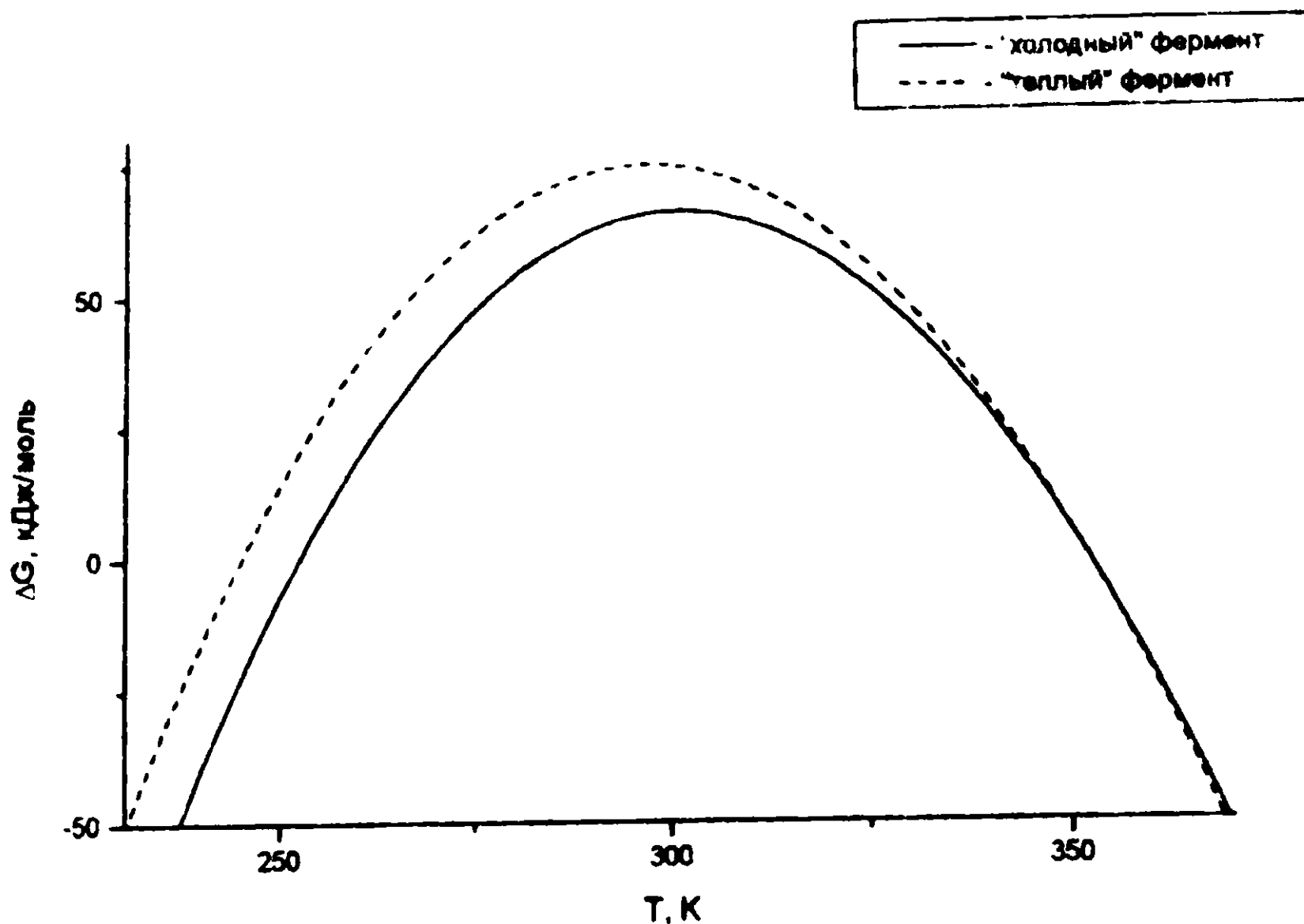


Рис. 6. Температурная зависимость разностей свободной энергии Гиббса между денатурированным и нативным состоянием «холодной» и «теплой» ЛДГ при рН 6.5.

Свободная энергия денатурации белков весьма важна для исследований сил, стабилизирующих их структуру. Для эффективного функционирования фермента его структура должна быть строго определенной в широком интервале условий и не должна легко нарушаться, т.е. энергия стабилизации структуры должна значительно превосходить RT . Это означает, что ΔG должна быть больше нескольких десятков кДж/моль. С другой стороны, для обеспечения эффективного функционирования системе необходима подвижность и она не должна быть слишком жесткой для реализации малых конформационных изменений без существенных энергетических затрат. Из полученной зависимости видно, что при температурах функционирования фермента, «холодный» вариант ЛДГ имеет несколько меньшие значения ΔG , чем «теплый», т.е. обладает несколько большей подвижностью структуры, что, вероятно, определяет его большую удельную активность по сравнению с «теплым» вариантом ЛДГ (176 ± 24 и 141 ± 14 Е/мг для «холодной» и «теплой» формы соответственно).

Число кооперативных единиц Γ уменьшается при понижении pH, что означает повышение кооперативности процесса денатурации ЛДГ. Следует отметить, что во всех случаях Γ несколько выше для холодной формы фермента. Встает вопрос о том, через какие промежуточные состояния проходит молекула ЛДГ в процессе денатурации. Предполагается, например (Кубе и др., 1987), что при повышении температуры переход ЛДГ в денатурированную форму осуществляется через стадию диссоциации тетрамера вначале на димеры, а затем на мономеры. Для более подробного анализа была проведена деконволюция полученных кривых в диапазоне pH 4.0 - 8.5

Данные по деконволюции указывают на то, что практически во всем диапазоне pH денатурационный переход для обеих форм ЛДГ состоит из трех независимых переходов, каждый из которых происходит по принципу «все или ничего», т.е. отвечает модели двух состояний. Полученные данные соответствуют результатам анализа рентгеноструктурных исследований ЛДГ из мышц акулы *Squalus acanthias* (Eventoff et al., 1977), в соответствии с которыми в молекуле ЛДГ можно выделить три независимых энергетических домена. Температуры T_m^1 , соответствующие серединам соответствующих переходов, практически не отличаются для «холодного» и «теплого» ферментов во всем диапазоне pH. Изменения энтальпии ΔH^1 во всех случаях выше для «теплого» фермента. При этом энтальпия второго и третьего переходов (как и полная энтальпия денатурации ΔH^{cal}) имеют максимум вблизи pH 6,0. Иным образом выглядит динамика первого перехода. При увеличении pH энтальпия первого перехода растет практически монотонно. Если при pH 4,0 вклад первого перехода в ΔH^{cal} фактически незаметен, то при pH 7.2 энтальпия первого перехода составляет 22% величины полной энтальпии (690 и 761 кДж/моль для «холодной» и «теплой» форм соответственно). Если отождествить первый переход с диссоциацией тетрамера ЛДГ, то при pH 4,0 эта диссоциация происходит уже при нормальной температуре.

Измерение термодинамических параметров денатурации ЛДГ при разной скорости нагрева.

Температурная денатурация большинства небольших глобулярных белков, а также некоторых сложных белков обратима, т.е. при

охлаждении до нормальной температуры эти белки возвращаются в нативное состояние (Privalov, 1979, 1986). В этом случае процесс денатурации является равновесным и к его описанию применимы законы равновесной термодинамики. Соблюдение этого условия экспериментально установлено только в отдельных случаях (Privalov, Khechidashvili, 1974). Однако многие сложные белки при повышении температуры денатурируют необратимо, что регистрируется отсутствием конформационных переходов при повторном сканировании на дифференциальном сканирующем калориметре (Sanchez-Ruiz et al., 1988). В данном случае встает вопрос о применимости методов равновесной термодинамики. Этот момент является ключевым при выборе подхода к интерпретации результатов калориметрического эксперимента. Изучение кинетических параметров процесса помогает разрешить этот вопрос.

Полученные результаты для T_m^1 и ΔH^1 для «холодной» и «теплой» формы ЛДГ при скоростях сканирования 1-4 К/мин свидетельствуют о том, что различия в величине энтальпии денатурации (ΔH^{cal}) между «холодной» и «теплой» формами ЛДГ определяются, в основном, различиями энтальпии первого перехода (ΔH^1), наблюдаемого в районе 72-73°C. Конформационные переходы были необратимыми, что подтверждалось отсутствием пиков при повторном сканировании.

Таким образом, акклимация рыб к низким и высоким температурам среды приводит к значимым изменениям энергетических параметров мышечной ЛДГ, которые вызваны, по-видимому, различиями в гидратации молекулы этого фермента. При всех изученных значениях pH и температурах сканирования, температурная денатурация ЛДГ из мышц происходит в три стадии. Это соответствует рентгеноструктурным данным, полученным для собачьей акулы. При этом значимые различия между «холодной» и «теплой» формами фермента проявляются, в основном, на первом этапе (предположительно на этапе диссоциации на субъединицы). К анализу термодинамических свойств этого процесса применимы методы равновесной термодинамики. Опираясь на результаты опытов по термоинактивации ЛДГ, можно заключить, что уже первый этап разрушения структуры молекулы при воздействии температуры приводит к потере ферментом каталитических свойств.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука. 1975, 253 с.
- Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука. 1985, 317 с.
- Даниленко А.Н., Персигов А.В., Полосухина Е.С., Клячко О.С., Есипова Н.Г., Озернюк Н.Д. Термодинамические свойства лактатдегидрогеназы из мышц рыб *Misgurnus fossilis*, адаптированных к разным температурам среды. // Биофизика. 1998. 43, 26-30.
- Клячко О.С., Полосухина Е.С., Озернюк Н.Д. Функциональные отличия лактатдегидрогеназы из мышц рыб, адаптированных к разным температурам среды // Доклады РАН. 1992. 325, 1246-1251.
- Клячко О.С., Полосухина Е.С., Озернюк Н.Д. Различия изоферментных спектров лактатдегидрогеназы в белой и красной скелетных мускулатуре рыб // Биофизика. 1993. 38, 596-601.
- Клячко О.С., Полосухина Е.С., Персиков А.В., Озернюк Н.Д. Кинетические различия лактатдегидрогеназы из мышц рыб при температурной адаптации // Биофизика. 1995. 40, 513-517.
- Кубе Д., Шныров В.Л., Пермяков Е.А., Иванов М.В., Наградова Н.К. Взаимосвязь между термостабильностью тетрамерной молекулы лактатдегидрогеназы из мышц свиньи и степенью занятости ее активных центров лигандами // Биохимия. 1987. 52, 1116-1125.
- Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: МГУ. 2000, 205 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. М.: Мир. 1988, 568 с.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М.: Мир. 1977, 398 с.
- Eventoff W., Rossmann M.G., Taylor S.S., Torff H.-J., Meyer H., Keil W., Kiltz H.-H. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1977. 74, 2677-2681.
- Galisteo M.L., Mateo P.L. and Sanchez-Ruiz J.M. // Biochemistry, 1991. 30, 2061-2066.
- Holbrook J.J., Liljas A., Steindal S., Rossmann M.G. Lactate dehydrogenase // The Enzymes. 1975. 11, 191-292.
- Ozernyuk N.D., Klyachko O.S., Polosukhina E.S. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles // Comp Biochem. Physiol. 1994. 107B, 141.-145.
- Place A.R., Power D. Purification and characterization of the lactate dehydrogenase (LDH-B) allozymes of *Fundulus heteroclitus* // J Biol. Chem. 1984. 259, 1299-1308.

- Privalov P.L.* Stability of proteins Small globular proteins // *Adv Protein Chem.* 1979 33, 167-241.
- Privalov P.L.* In. *Methods in Enzymology*. N.Y Acad.Press. 1986. 131, 4-51.
- Privalov P.L., Khechinashvili N.N.* A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study // *J. Mol. Biol.* 1974 86, 665-684.
- Privalov P.L., Makhatadze G.I.* // *J. Mol. Biol.* 1992 224, 715-723.
- Rossmann M.G., Adams M.J., Buehner M., Ford G.C., Hackert M.L., Lilijas A., Rao S.T., Banaszak L.J., Hill E., Tsernoglou D., Webb L* Molecular symmetry axes and subit interfaces in certain dehydrogenases // *J Mol. Biol.* 1973. 76, 533-537.
- Rossmann M.G., Adams M.J., Buehner M., Ford G.C., Hackert M.L., Lentz P.G., McPherson A., Schvitz R.W., Smiley I.E.* Structural constraints of possible mechanisms of lactate dehydrogenase as shown by high resolution studies of the apoenzyme and a variety of enzyme complexes // *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 1971. 36, 179-191.

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ
ЭРИТРОЦИТОВ И ГЕМОГЛОБИНОВ У РЫБ И
МЛЕКОПИТАЮЩИХ.**

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Сравнительное исследование структурно-функциональных особенностей клеточных мембран у пойкилотермных и гомойотермных организмов необходимо для выяснения фундаментальных закономерностей температурной адаптации клеток. Важнейшей характеристикой адаптационного процесса является структурная устойчивость плазматических мембран под действием температуры и других внешних факторов. С точки зрения биофизического анализа свойств клеток большой интерес представляет соотношение параметров терморезистентности со структурой мембраны и внутриклеточного содержимого.

Ранее (Борисова, Горюнов, 1997, Борисова, 1997; Amoako et al., 1997) было показано, что эритроциты жвачных животных имеют большую устойчивость как к температурному лизису, так и к действию гемолитиков по сравнению с другими видами. Поскольку гемоглобины жвачных отличаются не только аминокислотным составом глобиновых частей молекул, но также тем, что находятся в низкоаффинной конформации, был сделан вывод о корреляции между устойчивостью эритроцитов к гемолизу и сродством гемоглобина к кислороду. Это согласуется с данными о различиях в скоростях гемолиза эритроцитов ряда позвоночных (Ямайкина, Черницкий, 1989), а также о нарушении структуры и функций мембран этих клеток при гемоглобинопатиях, связанных с изменениями в глобиновых частях молекулы (Masala, Manca, 1989).

Энергия активации (E_a) термогемолиза эритроцитов (ТГЭ) находится в одном интервале с E_a денатурации белков (Путнам, 1956; Ямайкина, Черницкий, 1989), что допускает возможность сопряженности этих процессов. Однако, данные о температурах денатурации гемоглобина (Борисова, Горюнов, 1997), а также о лизисе липосом, нагруженных гемоглобином (Lerock et al., 1989), свидетельствуют об от-

существовании взаимосвязи между теплоустойчивостью внутриклеточного содержимого и терморезистентностью эритроцитов. Кроме того, наши результаты (Борисова, Горюнов, 1997) не обнаруживают межвидовой корреляции константы скорости ТГЭ с энергией активации ТГЭ и позволяют предположить, что процессы, которые характеризуются величиной E_a , не вносят решающего вклада в межвидовые различия в терморезистентности эритроцитов. Это указывает на возможную важную роль фосфолипидного состава в устойчивости клеток, хотя и не позволяет исключить вклад мембранных белков в процессе гемолиза.

Пойкилотермные организмы способны регулировать липидный состав мембран, приспособляясь к температуре окружающей среды, а мембраны рыб функционируют в диапазоне, который лежит значительно ниже, чем у млекопитающих, которые не синтезируют новых липидов в ответ на изменение температуры. Исходя из этого, целью настоящей работы было сравнительное исследование терморезистентности эритроцитов и денатурации гемоглобинов некоторых рыб и млекопитающих, а также изучение этих показателей у форели *Salmo irideus* при сезонных изменениях температуры окружающей среды.

Материалы и методы

В работе использовали эритроциты человека, ряда млекопитающих и рыб. Кровь здоровых доноров I(0) группы, а также быка (*Bos laurus*), барана (*Ovis*) и песца (*Alopex lagopus*) отбирали с использованием гемоконсерванта "Глюгицир" (2% раствор цитрата натрия в 3% растворе глюкозы). Белуга (*Huso huso*) была выловлена в низовьях Волги в середине мая. В опытах на форели *Salmo irideus* использовали заводскую рыбу, получавшую стандартный корм и содержащуюся круглогодично в садках в воде р. Суна. Кровь брали в течение года ежемесячно, контролируя температуру воды. Использовались рыбы трехлетнего возраста, самцы и самки весом 1,2 - 2,2 кг. Кровь у белуги и форели брали из хвостовой вены после каудэктомии. В качестве антикоагулянта использовали раствор гепарина 5000 ед/мл, который добавляли во флаконы для сбора крови из расчета 100 мкл на 10 мл крови. Кровь хранили на льду, затем центрифугировали (2000 об/мин, 10 мин); после удаления плазмы и слоя лейкоцитов осадок эритроцитов трижды промывали в тех же условиях забуференным физиологическим

раствором (150 mM NaCl в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,4) Для выделения эритроцитов форели использовали раствор Кортланда без глюкозы (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,6 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 3 mM NaH₂PO₄·H₂O, 12 mM NaHCO₃, pH 8,0)

Термогемолиз эритроцитов проводили равновесным методом в интервале температур 38-66°C. Суспензию эритроцитов выдерживали на водяной бане при фиксированной температуре (температура гемолиза) в течение времени t и сразу же переносили на холод. Спустя 3-4 часа оценивали количество гемоглобина, выделившегося из лизированных эритроцитов.

За выходом гемоглобина из клеток следили по поглощению на спектрофотометре "Specol 11" (Carl Zeiss, Jena) при длине волны 540 нм. Амплитуду (степень) гемолиза определяли как долю лизированных клеток. По данным о степени гемолиза за определенные промежутки времени строили кинетические кривые гемолиза при различных температурах. Кинетические кривые ТГЭ имеют сигмовидную форму, характерную для нормального закона распределения и свидетельствующую о кооперативности процесса. Количественно гемолиз оценивали по скорости процесса $k_{50} = 1/\tau_{50}$ (мин⁻¹), где τ_{50} - время, за которое лизировали 50% клеток суспензии (Позтова, Терсков, 1967, Ямайкина, Черницкий, 1989).

Гемоглобин выделяли из эритроцитов по стандартной методике (Antonini, Brunori, 1971): проводили осмотический лизис клеток 5 mM фосфатным буфером, спустя час строму осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 минут на центрифуге VAC 602. Супернатант пропускали через колонку с гелем TOYO PEARL HW 55 (TOYO SODA, Japan). Концентрацию белка определяли по формуле $c = (A_{235} - A_{280})/2,51$ (Kelb, 1977).

Исследования тепловой денатурации гемоглобинов проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (ИБП РАН, Пущино) в интервале температур 10-110°C при концентрации белка 2-4 мг/мл (0,15 M натрий-фосфатный буфер, pH 7,3), при скорости сканирования 1°C/мин и избыточном давлении 1,5 атм. Шкалу теплоемкости калибровали по эффекту Джоуля-Ленца. Температуру денатурации определяли из экспериментальных эндотерм по Привалову (Privalov, Khechinashvili, 1974).

Результаты

Кинетические кривые ТГЭ имели типичную сигмоидную форму для всех изученных видов позвоночных. В табл. 1 представлены значения константы скорости гемолиза для всех исследованных организмов. Видно, что устойчивость эритроцитов млекопитающих к высокотемпературному лизису выше, чем у рыб, т.к. те же или близкие значения констант скоростей достигаются у последних при более низких температурах. Среди млекопитающих также наблюдается некоторая дифференциация: устойчивость клеток жвачных (барана, быка) выше, чем у человека и песка. Выраженная зависимость k_{50} от температуры гемолиза позволяет представить эти данные в координатах Аррениуса и вычислить энергии активации E_a ТГЭ. Сравнение E_a у всех изученных видов представлено в табл. 2, причем для форели дан интервал сезонных вариаций E_a при изменении температуры среды в диапазоне 0-19,5°C. По сравнению с константой скорости энергия активации, как параметр ТГЭ, хотя и отличается у разных видов, в целом не следует тенденции, приведенной в табл. 1. При этом данные для форели показывают, что вариации E_a , обусловленные межвидовыми отличиями, полностью перекрываются сезонными изменениями.

Таблица 1

Константы скорости термогемолиза эритроцитов (k_{50} , мин⁻¹) некоторых видов млекопитающих и рыб при разных температурах гемолиза

°C	Баран	Бык	Человек	Песец	Белуга, 13°C	Форель, 16°C
66	—	0,83	—	—	—	—
64	0,22	0,39	—	—	—	—
62	0,09	0,15	—	1,33	—	—
60	0,05	—	0,77	0,80	—	—
58	—	—	0,38	0,51	—	—
56	—	—	0,20	0,28	—	—
54	—	—	0,06	0,17	1,68	—
52	—	—	—	—	0,49	—
50	—	—	—	—	0,28	—
44	—	—	—	—	—	0,50
42	—	—	—	—	—	0,26
40	—	—	—	—	—	0,22

Таблица 2

Энергия активации термогемолиза эритроцитов E_a и температуры денатурации T_d метгемоглобинов некоторых видов млекопитающих и рыб

Вид	E_a (кДж/моль)	T_d ($^{\circ}\text{C}$)
Баран	370 ± 10	65
Бык	400 ± 10	65
Песец	220 ± 15	59
Человек	340 ± 20	62
Белуга (13°C)	350 ± 25	62
Форель	190-480	56, 62*

* Для форели даны температуры перехода двух составляющих пика денатурации.

На рис. 1 представлены более подробные данные о сезонных изменениях энергии активации ТГЭ форели. Из них явствует, что сезонные изменения E_a имеют выраженный характер и коррелируют с температурой воды, при которой они зарегистрированы. Наименьшие значения наблюдаются в период с июля по сентябрь при наиболее высокой температуре воды в диапазоне $16-19,5^{\circ}\text{C}$ ($190-240$ кДж/моль). В осенний период при охлаждении воды от 16 до 2°C энергия активации термогемолиза быстро повышается и за 1-1,5 месяца достигает уровня $430-480$ кДж/моль, который сохраняется, пока температура воды находится в интервале $0-1^{\circ}\text{C}$. В весенние месяцы, при повышении температуры воды от 1 до 16°C имеет место обратная картина: вновь быстро, за 1-1,5 месяца, величина E_a снижается до летних значений. Зимний уровень E_a поддерживается в течение шести месяцев - значительно дольше летнего, трехмесячного, что также коррелирует с периодами зимних и летних температур воды.

На рис. 2 приведены сезонные изменения константы скорости k_{50} при трех различных температурах гемолиза для форели. Они также в целом коррелируют с сезонными изменениями температуры воды, однако это соответствие не столь однозначное. Если при температуре гемолиза 44°C минимальные значения k_{50} строго соответствуют летним температурам воды, то при понижении температуры гемолиза его амплитуда смещается в сторону зимнего периода. При 42°C минимум уже примерно соответствует августу, существенно расширяясь. При

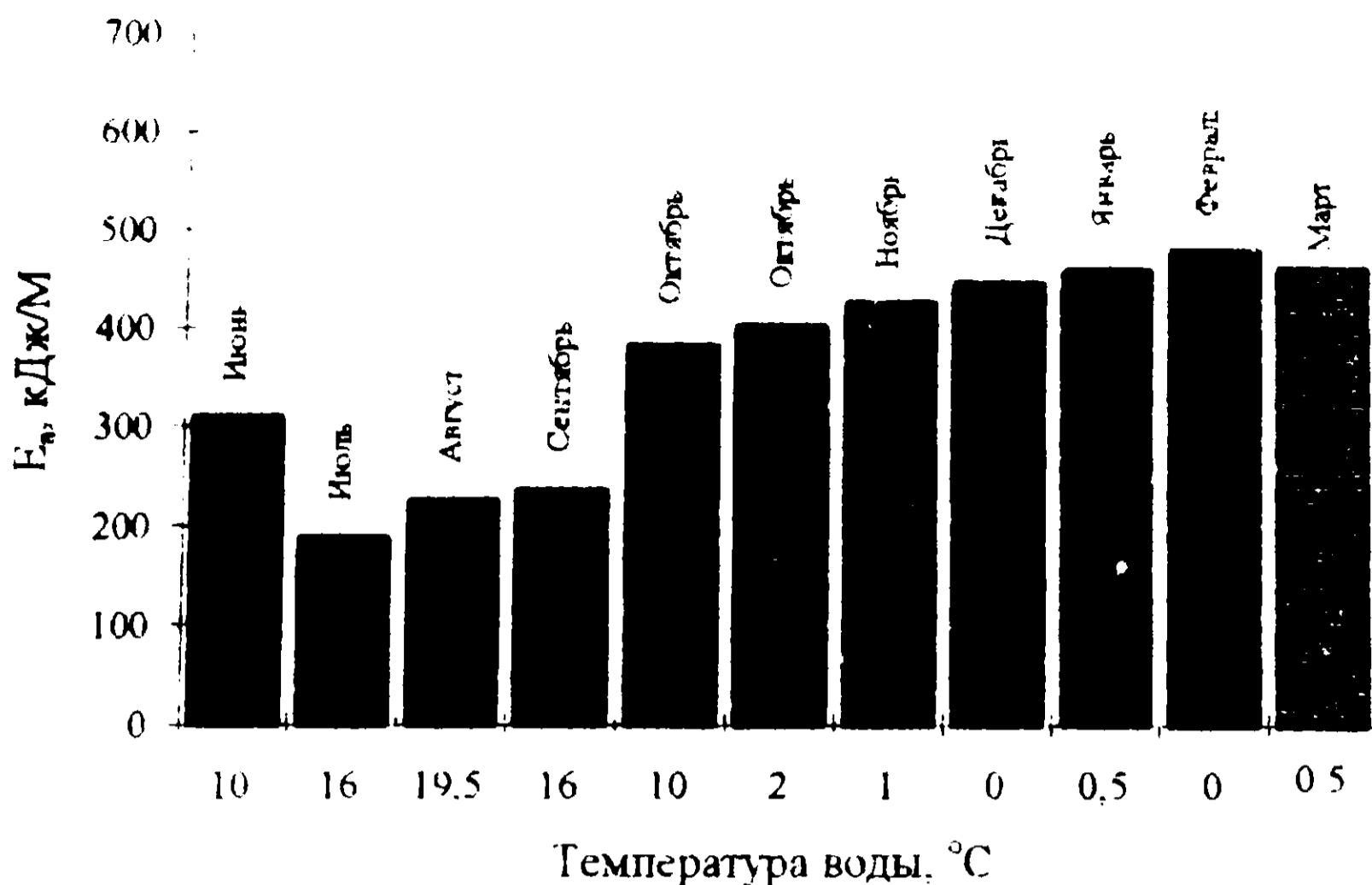


Рис 1. Сезонные изменения энергии активации (E_a) термогемолиза эритроцитов форели *Salmo irideus* и температуры воды, при которой они зарегистрированы. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

40°C можно выделить лишь снижение k_{50} в летние месяцы, а подъем растягивается на период до зимних температур.

Еще одной важной особенностью сезонных изменений k_{50} являются различия в характере аррениусовских зависимостей $\ln k_{50}(1/T)$. Во многих случаях значения константы скорости ТГЭ хорошо ложатся на прямую, однозначно определяя величину энергии активации (рис. 3а). В других случаях прямая, аппроксимирующая эту зависимость, выходит за пределы стандартных погрешностей (рис. 3б), что дает основание предполагать наличие излома. Это относится в первую очередь к летним месяцам с диапазоном температуры воды 16-19,5°C. Величина E_a , рассчитанная по наклону таких аррениусовских прямых, получает некоторую неопределенность. Если рассчитать E_a по более крутому участку аррениусовской зависимости, значения увеличатся с 190 до 270 кДж/моль в июле, с 226 до 297 кДж/моль в августе, и с 237 до 378 кДж/моль в сентябре. Однако и в таком случае энергия актива-

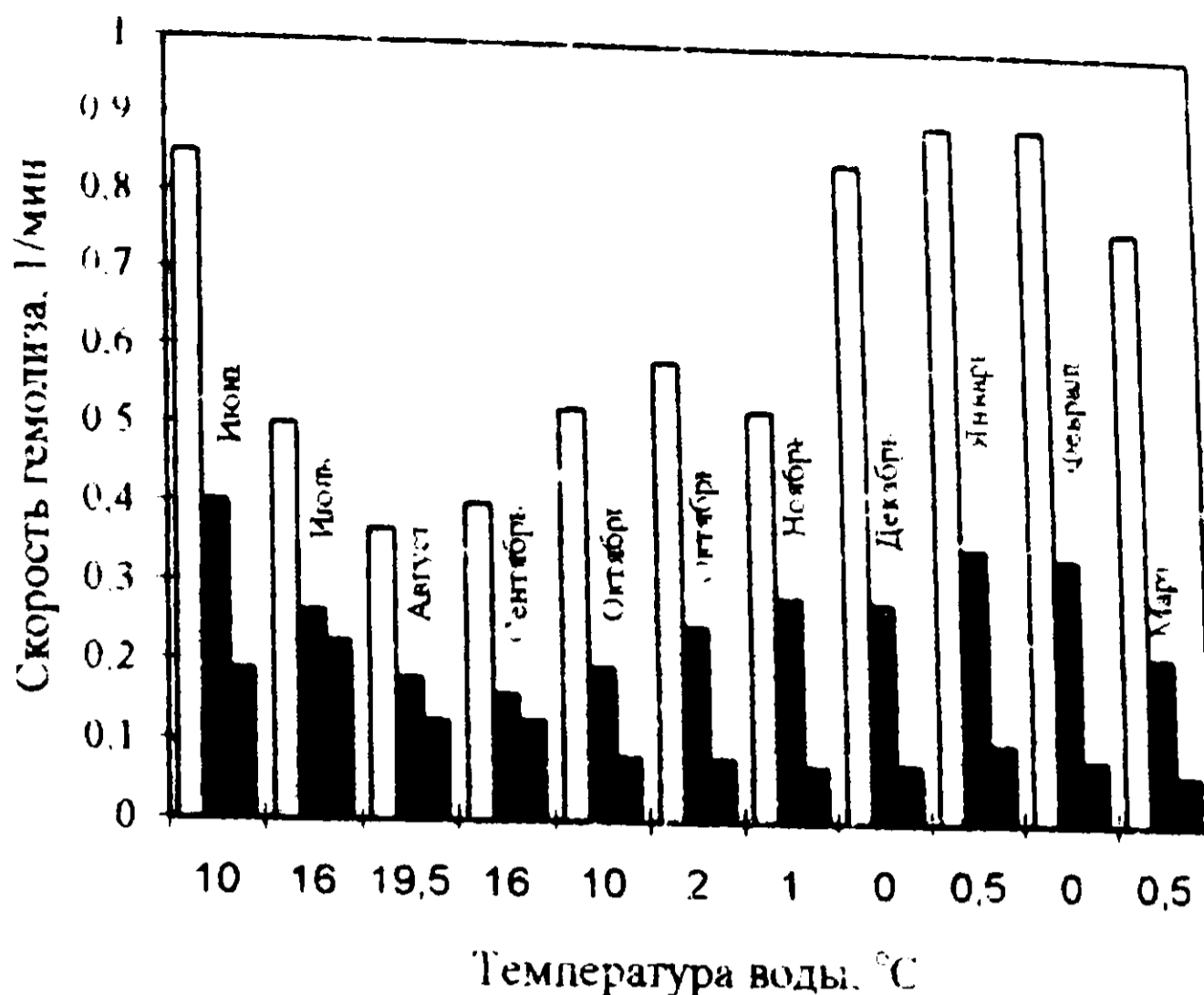


Рис. 2. Сезонные изменения константы скорости термогемолиза (k_{50}) эритроцитов форели *Salmo irideus* и температуры воды, при которой они зарегистрированы, при разных температурах гемолиза. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение \square - 44°C; \square - 42°C; \blacksquare - 40°C

ции ТГЭ будет иметь наиболее низкие значения в интервале самых высоких температур воды: 16°C (июль) и 19,5°C (август), сохраняя общую тенденцию, отмеченную на рис. 1.

Анализируя роль внутриклеточного содержимого в процессе ТГЭ, мы изучали денатурацию гемоглобина форели как в составе интактных эритроцитов, так и в растворе. Микрокалориметрические термограммы имели в обоих случаях характерную форму с большим главным пиком денатурации гемоглобина. Для форели пик имел двойную вершину. Хорошая разрешенность двух составляющих позволяла определить две температуры перехода.

Измеренные значения показаны в табл. 2. Эти результаты не выявили специфических различий в теплоустойчивости гемоглобинов млекопитающих и рыб. Более подробные данные получены для форели: температуры денатурации не имели выраженных сезонных изме-

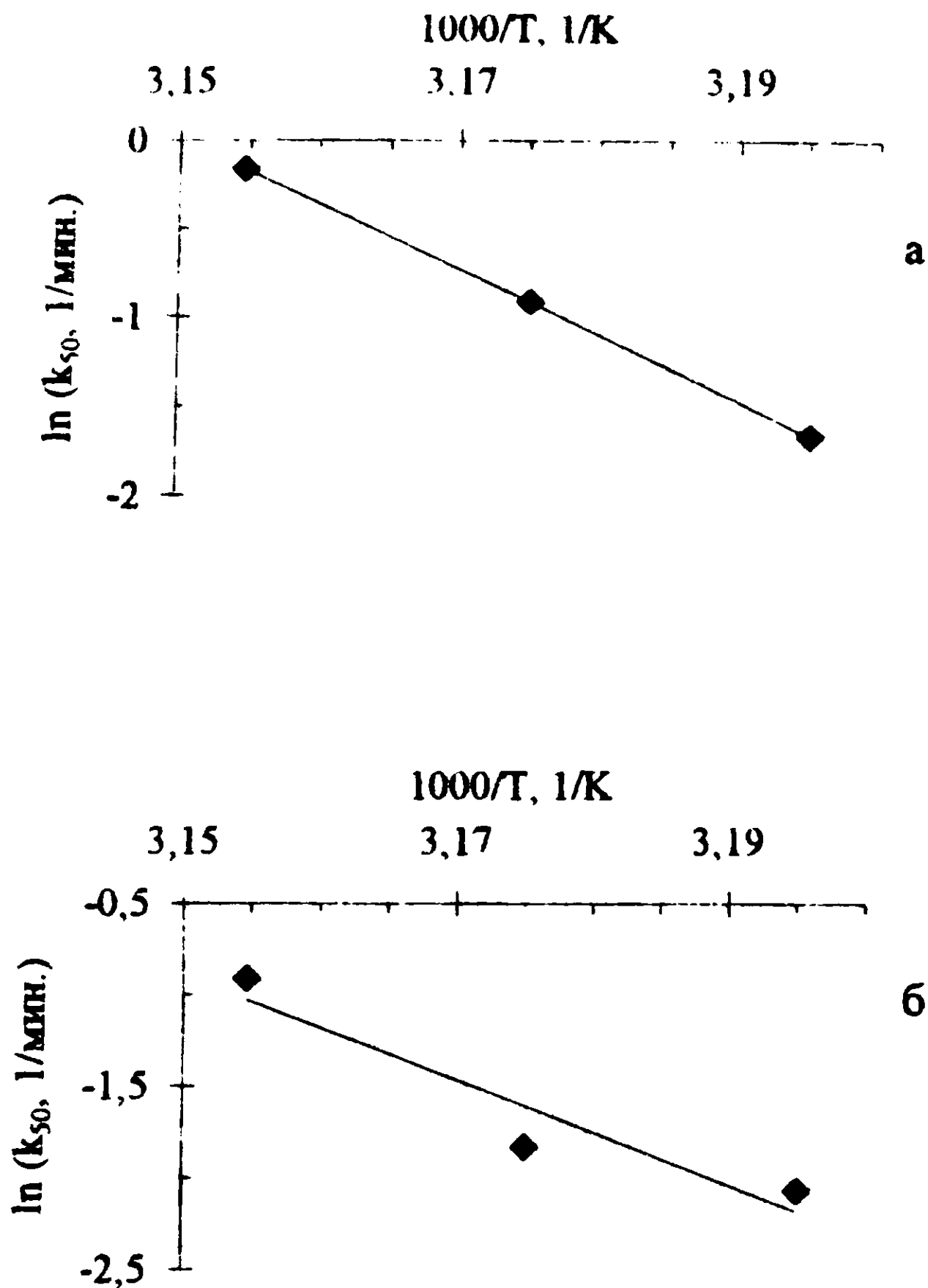


Рис. 3. Зависимость константы скорости термогемолиза эритроцитов форели *Salmo irideus* от температуры гемолиза в координатах Аррениуса: (а) - в июне при температуре воды 10°C и (б) - в сентябре при температуре воды 16°C .

нений и практически не менялись с температурой воды. Они составили $56,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (интервал изменения $55,5-56,6^{\circ}\text{C}$) для первого пика и $62,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ($62,2-63,2^{\circ}\text{C}$) для второго пика в растворе гемоглобина. В составе intactных эритроцитов средние температуры переходов были $57,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ($56,1-57,9^{\circ}\text{C}$) - первый пик; и $62,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ($61,2-62,6^{\circ}\text{C}$) -

второй пик. Разница в температурах переходов двух пиков также не зависела от сезона и составляла $6.7 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ для раствора гемоглобина и $5.2 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ для гемоглобина в эритроцитах. Приведенные данные свидетельствуют об отсутствии корреляции между терморезистентностью эритроцитов и теплоустойчивостью гемоглобина форели во всем диапазоне сезонных изменений температуры.

Обсуждение

Анализируя данные по денатурации гемоглобинов, можно видеть, что тепловые переходы данного белка происходят при температурах, значительно превышающих те, при которых может быть достигнут завершённый гемолиз эритроцитов. Различие особенно велико для рыб (табл. 1, 2). Вместе с отсутствием взаимосогласованности как сезонных, так и видовых изменений терморезистентности эритроцитов, характеризуемой константами скоростей и энергиями активации ТГЭ, и температуры денатурации внутриклеточного гемоглобина это подтверждает вывод о том, что денатурация гемоглобина не является определяющим процессом для ТГЭ (Lerock et al., 1989, Борисова, Горюнов, 1997). Для форели завершённый гемолиз может быть достигнут за время порядка 1,5 час уже при 38°C . При этой температуре не только гемоглобин, но и мембранные белки далеки от начальных стадий денатурации. Так, при температурах ниже 45°C спектрин сохраняется в нативном состоянии (Rakow, Hochmuth, 1975, Заводник и др., 1991) и лишь при температуре выше 42°C начинаются изменения в структуре мембранных белков, регистрируемые микрокалориметрически (Gershfeld, Murayama, 1988, Акоев и др., 1991, Zavodnik et al., 1996, Zadan et al., 1997). Эти данные свидетельствуют в пользу важной роли фосфолипидов мембран в термогемолизе.

Широко известна общая тенденция к увеличению степени ненасыщенности липидов при адаптации организмов к пониженным температурам, тогда как повышение температуры вызывает уменьшение содержания ненасыщенных цепей (как правило, с одной или двумя двойными связями цис-) (Крепс, 1981). По сравнению с млекопитающими у рыб относительное содержание полиненасыщенных липидов в мембранах эритроцитов повышено, а насыщенных - понижено (Чер-

ницкий, Воробей, 1981. Hornsey, 1987). Установлены различия в содержании кислот $\omega 3$ - и $\omega 6$ -ряда у представителей этих двух классов позвоночных в фосфолипидах мозга, легких, почек и крови. Основные фосфолипиды - фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и монофосфоинозитид - всех висцеральных органов и мозга рыб обогащены (иногда на порядок) докозогексаеновой кислотой (C22:6 $\omega 3$), тогда как висцеральные органы и мозг млекопитающих содержат в 5-10 раз больше линолевой (C18:2 $\omega 6$) и в 1,5-2 раза больше арахидоновой (C20:4 $\omega 6$) кислот по сравнению с рыбами (Забелинский и др., 1996). Для форели показано, что адаптация к пониженной температуре (6°C) сопровождалась увеличением содержания в фосфолипидах крови ненасыщенных жирных кислот с параллельным уменьшением содержания кислоты C16:0 и моноеновых кислот (Wallaert, Babin, 1994). Исходя из этого, можно предположить, что пониженная терморезистентность эритроцитов рыб по сравнению с млекопитающими связана с отличиями в свойствах липидной части мембраны эритроцита. Этому соответствует и выраженная согласованность сезонных изменений k_{50} и E_a и температуры воды.

Роль фосфолипидов в ТГЭ рассматривается в рамках механизма структурной трансформации моновислойной мембраны эритроцита в поливислойную при критической температуре, которая соответствует физиологическому диапазону (Gershfeld, 1988, 1997). С другой стороны, возможное значение разного содержания $\omega 3$ и $\omega 6$ кислот для терморезистентности эритроцитов связано с тем, что описанные различия могут приводить к образованию у млекопитающих внутри бислоя мембраны более протяженной насыщенной углеводородной зоны из 10 углеродных атомов по сравнению с 4 углеродными атомами у рыб (Забелинский и др., 1996). Создание такой зоны приводит к большей структурной прочности бислоя, что обеспечивает сопротивление внешним деформирующим воздействиям, так как известно, что более протяженные насыщенные углеводородные цепи упаковываются более плотно по сравнению с короткими цепями. Вместе с тем плотная углеводородная зона в центре бислоя создает большее препятствие для проникновения молекул O_2 у млекопитающих по сравнению с рыбами.

Однако полученные нами большие значения энергии активации ТГЭ, характерные для денатурации полипептидов, продолжают

оставаться веским указанием на вклад белков в ТГЭ. Кроме того, участие белков и в особенности спектрина в ТГЭ может быть обусловлено не их денатурацией, а изменением физико-химического баланса белок-липидных взаимодействий в мембране с повышением температуры, дестабилизацией взаимодействий спектринового каркаса с липидным бислоем (Заводник и др., 1991).

Сопоставляя значения E_a и k_{50} из табл. 1 и 2, можно видеть, что их изменения не согласованы: E_a для эритроцитов барана, человека и белуги практически одинаковы, в то время как терморезистентность клеток, судя по значениям k_{50} , существенно различается. Аналогичный вывод следует из сравнения рис. 2 и 3. Более того, если рассматривать E_a и k_{50} в качестве характеристик ТГЭ и терморезистентности, то в случае форели их сезонные изменения находятся в противоречии: более высоким значениям константы скорости ТГЭ соответствуют не меньшие, как следовало ожидать, а большие значения энергии активации этого процесса.

Сезонные и межвидовые вариации терморезистентности эритроцитов должны быть связаны с различиями в структурной организации бислоя. У водных организмов реорганизация может происходить при акклиматизации к новым условиям среды, в частности, при переходе через предпочитаемую температуру, которая для половозрелой форели составляет 11-14°C (Алабастер. Ллойд, 1974). Например, весенне-летнее снижение характеризующей терморезистентность константы скорости k_{50} , вероятно, обусловлено уменьшением ее составляющей (фактора), которая доминирует над составляющей, определяющейся энергией E_a . В результате спад E_a не приводит к повышению k_{50} . Величина E_a отражает главным образом вклад белка в ТГЭ, а k_{50} , напротив, в первую очередь отражает вклад другого фактора как преобладающего и представляет собой более адекватную интегральную характеристику терморезистентности. Этим фактором может выступать жидкость бислоя, которая регулируется фосфолипидным составом. Таким образом, процессы, характеризующиеся величиной E_a , не вносят решающего вклада как в межвидовые, так и в сезонные изменения суммарной теплоустойчивости клеток к гемолизу.

Определенную роль в противоречивых сезонных изменениях k_{50} и E_a может иметь распределение клеток по возрастам, которое ос-

ложняет кинетический анализ. Предполагается, что именно оно обуславливает сигмоидную форму кривых гемолиза. Так, эритроциты форели делятся на три фракции, различающиеся по физико-химическим свойствам, связанным с фосфолипидным составом (Gabbianelli et al., 1996). В зависимости от температуры процесс ТГЭ имеет несколько механизмов, различающихся энергиями активации. Судя по большим значениям E_a (табл. 2), исследованные нами интервалы температур, как правило, лежат на аррениусовских зависимостях $\ln k_{50}$ ($1/T$) выше точек перегиба, которые отражают переходы от одного механизма ТГЭ к другому. Появление признаков перегиба при сезонных изменениях у форели (16-19,5°C) указывает на смещение точки перехода между механизмами, определяющими терморезистентность эритроцитов, в сторону более высоких температур.

Заключение

Устойчивость эритроцитов млекопитающих к высокотемпературному лизису оказалась выше, чем у эритроцитов рыб. Термоустойчивость эритроцитов форели к гемолизу претерпевает выраженные сезонные изменения, согласующиеся с изменениями температуры воды, в частности, с переходом через предпочитаемую температуру и связанные, вероятно, со структурной реорганизацией клеточной мембраны. Межвидовые вариации энергии активации ТГЭ полностью перекрываются сезонными изменениями этой величины. Анализ денатурации гемоглобина и мембранных белков, а также несогласованность изменений k_{50} и E_a свидетельствуют о важном вкладе процессов с участием фосфолипидного компонента мембраны в устойчивость к ТГЭ. Полученные данные указывают на взаимосвязь между функциональным состоянием гемоглобина (сродством к кислороду) и эритроцитов (устойчивостью к ТГЭ), которая, вероятно, не является результатом взаимодействия молекулярных структур мембраны и цитозоля внутри эритроцита, а представляет собой параллельные адаптивные реакции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 97-04-48247

ЛИТЕРАТУРА

- Акоев В.Р., Бобровский Р.В., Жадов Г.Г., Салия Ц.А., Егелева Я., Шныров В.Л. Калориметрическое исследование структурных переходов в мембранах эритроцитов собаки // Биол. мембраны 1991. 8, 78-84.
- Алабастер М., Ллойд Д. Критерии качества воды для пресноводных рыб М. Легкая промышленность. 1974, 500 с.
- Борисова А.Г., Горюнов А.С. Термогемолит эритроцитов различающихся по сродству гемоглобина к кислороду // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1997. 33, 142-147.
- Борисова А.Г. О влиянии абиегината натрия на термогемолит эритроцитов в изотонической среде // Биофизика 1997. 42, 1301-1302.
- Забелинский С.А., Чеботарева М.А., Кривченко А.И. Сравнительное исследование фосфолипидов и их жирнокислотного состава в разных органах млекопитающих и рыб. Роль стереометрии фосфолипидных молекул в процессе извлечения O_2 из окружающей среды у этих групп животных // Журн. эвол. биохимии и физиологии 1996. 32, 722-734.
- Заводник И.Б., Пилецкая Т.П., Степуро И.И. Влияние температуры на лизис эритроцитов человека пальмитиновой кислотой // Биофизика. 1991. 36, 1056-1060.
- Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука. 1981.
- Путнам Ф. Денатурация белков. В кн.: Нейрат Г., Бэйли К. (ред.) Белки. 2 М.: Изд-во Иностранной литературы. 1956, 602-693.
- Поэтова В.Т., Терсков И.А. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М.: 1967.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981.
- Ямайкина И.В., Черницкий Е.А. Денатурация гемоглобина - первая стадия термогемолита эритроцитов // Биофизика 1989. 34, 656-659.
- Amoako K.K., Goto I., Misawa N., Xu D.L., Shinjo T. Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes // FEMS Microbiol. Lett. 1997. 150, 101-106.
- Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands // Frontiers in biology. Amsterdam, London: North-Holland Publ. Co. 1971. 21, 152.
- Giabbianelli R., Santroni A.M., Falcioni G., Bertoli E., Curatola G., Zolese G. Physicochemical characterization of plasma membranes from density-separated trout erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. 1996. 336, 157-162.
- Gershfeld N.I., Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane

- bilayers: temperature dependence of hemolysis // *J. Membr. Biol.* 1988. 101, 67-72.
- Gershfeld N.L., Ginsberg L.* Probing the critical unilamellar state of membranes // *J. Membr. Biol.* 1997. 156, 279-286.
- Hornsey D.J., El-Missiry M.A.* Temperature dependent membrane changes in human and eel red blood cells // *Temperature and animal cells. Society for Experimental Biology. Great Britain, 1987, 459-460.*
- Kelb V.F.* A new spectroscopic assay for protein in cell extracts // *Anal Biochem.* 1977. 82, 362-371.
- Lepock J.R., Frey H.E., Bayne H., Markus J.* Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes.* 1989. 980, 191-201.
- Masala B., Manca L.K.* Hemoglobinopathies and their implications in red blood cell membrane and metabolism // *Ital. J. Biochem.* 1989. 38, 234-246.
- Privalov P.L., Khechinashvili N.N.* A globular protein structure: a calorimetric study // *J. Mol. Biol.* 1974. 86, 665-684.
- Rakow A.L., Hochmuth R.M.* Effect of heat treatment on the elasticity of human erythrocytes membranes // *Biophys. J.* 1975. 15, 1095-1100.
- Wallaert C., Babin P.J.* Thermal adaptation affects the fatty acid composition of plasma phospholipids in trout // *Lipids.* 1994. 29, 373-419.
- Zadan G.G., Cobaleda C., Jones A.L., Leal F., Villar E., Shnyrov V.L.* Protein involvement in thermally induced structural transitions of pig erythrocyte ghosts // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. 42, 11-20.
- Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Bryszewska M.* Effects of free fatty acids on the lipid and protein components of erythrocyte membrane // *Membr. and Cell Biol.* 1996. 9, 537-546.

ТЕМПЕРАТУРНАЯ АККЛИМАЦИЯ И ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИЯ РЫБ

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

В толерантном диапазоне жизнедеятельности, ограниченном верхними и нижними летальными границами, каждый вид водных животных характеризуется определенными оптимальными областями температур, в которых воспроизводство, рост и питание отдельных особей протекают наиболее эффективно (Бигон и др., 1989; Голованов и др., 1997; Шмидт-Нильсен, 1982). Зоны температурного оптимума изменяются в процессе онтогенеза, существенно отличаясь у молоди и взрослых рыб, а также в разные сезоны года (Голованов, 1996, Голованов и др., 1997, Озернюк и др., 1987, Свирский, Голованов, 1991; Reynolds, Casterlin, 1979).

Температурные требования рыб, температура тела которых в значительной мере зависит от условий окружающей среды, определяются комплексом адаптаций, используемых рыбами в различные периоды жизненного цикла. Выделяют несколько основных форм температурной адаптации:

1. Акклимация, связанная с компенсаторными изменениями метаболизма на клеточном уровне, начинающимися через несколько часов и завершающимися спустя 1-2 недели после начала воздействия.

2. Поведенческая терморегуляция или терморегуляционное поведение - самопроизвольный выбор оптимальных температурных условий (конечных избираемых температур) в термоградиентной среде.

3. Адаптация к кратковременному пребыванию в сублетальных температурах (у границ жизнедеятельности) При этом механизмы адаптаций к воздействию тепла и холода заметно различаются.

4. Оцепенение ("спячка"), во время которого рыбы умеренных широт переживают неблагоприятные условия зимнего периода с минимальными тратами накопленных резервных веществ.

Указанные формы, входящие по классификации Г. Л. Шкорба-това (1982, 1986) в класс онтогенетических адаптаций (латентации,

конформации, регуляции, компенсации), находятся в тесной взаимосвязи друг с другом. Одной из основных форм приспособления к температурному фактору на физиолого-биохимическом уровне, очевидно, следует считать акклимацию, на фоне которой протекают и остальные разновидности адаптационных процессов. При возможности выбора температурных условий рыбы чаще используют поведенческую терморегуляцию, позволяющую существенно оптимизировать параметры роста и развития. Проявление и взаимодействие основных форм адаптаций гидробионтов, в частности, акклимации и поведенческой терморегуляции, представляет существенный интерес в плане установления физиолого-биохимических, экологических и эволюционных закономерностей адаптации как биологического процесса.

Характерные особенности температурной акклимации и поведенческой терморегуляции

В исследованиях температурной акклимации водных организмов – рыб и беспозвоночных – накоплен большой экспериментальный материал, характеризующий различные типы акклимации (Precht et al., 1966, 1973; Precht, Lindner, 1966), динамику процесса (Строганов, 1956; Klicka, 1965, Smith, 1976, 1980; Виленкин, 1977; Хлебович, 1981; Evans, 1990; и др.), феноменологию, механизмы и энергообеспечение акклимации (Хлебович, 1981; Романенко и др., 1991), а также общие аспекты температурной акклимации и ее связь с другими явлениями (Fry, 1947; Проссер, 1964, 1977; Brett, 1970; Fry, Hochachka, 1970; Kinne, 1970; Хлебович, 1981 и др.).

В то же время в области изучения поведенческой терморегуляции рыб и беспозвоночных только в последние десятилетия были проведены исследования механизмов, причин и динамики преферентных реакций (Crawshaw, 1977; Reynolds, Casterlin, 1979; Лапкин и др., 1979, 1981, 1991; Голованов, 1984; Константинов, Зданович, 1993; Свирский, 1996), а также суточных, сезонных и возрастных особенностей термопреферендума гидробионтов (Reynolds, Casterlin, 1979; Лапкин и др., 1981, 1991; Кауфман, 1989, 1995; Свирский, Голованов, 1991, 1999; Голованов, 1996; Свирский, 1996; Голованов и др., 1997; и др.) Проанализировано влияние различных биотических и абиотиче-

ских факторов на терморегуляционное поведение (Reynolds, Casterlin, 1979; Кауфман, 1989, 1995; Голованов, 1996), выявлены различные типы поведенческой терморегуляции рыб в градиентных условиях (Лапкин и др., 1979, 1981, 1991; Голованов, 1984, 1996). Количество работ, в которых одновременно рассматриваются обе формы температурной адаптации, а также их взаимоотношения, ограничено (Roberts, 1974; Reynolds, Casterlin, 1980; Crawshaw et al., 1982; Evans, 1990; Kelsh, Neill, 1990; Константинов и др., 1996). Вопрос влияния температуры акклимации водных животных на особенности их терморегуляционного поведения заслуживает особого рассмотрения (Лапкин и др., 1979; Свирский, Голованов, 1991; Свирский, 1996).

Не вызывает сомнения факт, что процессы как температурной акклимации, так и поведенческой терморегуляции, проявляются у водных животных во всем толерантном диапазоне жизнедеятельности, от нижних до верхних летальных температур. Все виды рыб, обитающие в умеренных, тропических, арктических и антарктических широтах, независимо от температур обитания, демонстрируют явление температурной компенсации того или иного типа, а при попадании в гетеротермальные условия для них характерно проявление реакции поведенческой терморегуляции (Precht et al., 1966, 1973; Проссер, 1977, Reynolds, Casterlin, 1980; Голованов, 1996).

Обе формы адаптации имеют как черты сходства, так и характерные особенности. В случае температурной акклимации при изменении условий обитания животное вынуждено пассивно "следовать" за температурой окружающей среды. При наличии термоградиентной среды поведенческая терморегуляция гидробионтов осуществляется (в отличие от акклимации) самопроизвольно, спонтанно. Рыбы активно выбирают более теплые или холодные зоны температур, соответствующие их эколого-физиологическому оптимуму (Fry, 1947; Ивлев, 1958; Ивлев, Лейзерович, 1960; Reynolds, Casterlin, 1979; Голованов, 1996). Для обеих форм адаптации характерна определенная последовательность этапов, однако их продолжительность отличается.

Следуя за адаптивной реакцией и системами регуляции, акклимация (или компенсаторное изменение, возникающее в организме в ответ на длительное отклонение фактора среды от первоначального уровня) характеризуется определенной продолжительностью: от суток

до 1–4-х недель (Строганов, 1956; Проссер, 1977; Хлебович, 1981; Smith, 1976). Непосредственно об акклимации судят на основании компенсаторных изменений роста, метаболизма, различных форм активности или устойчивости (резистентности). Любой из этих количественных показателей может быть с равным правом использован для характеристики процесса и временных параметров акклимации.

При реакции на изменение температуры Кинне (Kinne, 1964, 1970) выделяет фазы немедленного ответа (через секунды–минуты после начала действия: мышечные сокращения, изменение окраски, поведенческие акты, приводящие к шоковым реакциям и перерегулированию), фазы стабилизации (в течение часов, дней и недель) и нового устойчивого состояния. Следуя Прехту (Precht et al., 1966), типы индивидуальной приспособляемости многоклеточных по срокам завершения процесса делятся на адаптивные реакции (секунды–минуты), регуляцию (часы) и собственно акклимацию (сутки–недели). Три отчетливых этапа температурной адаптации по функциональным и биохимическим показателям (15–20, 24–48 час и 2–3 недели) различает Смит (Smith, 1976).

Конкретные сроки акклимации, определяемые разными исследователями по различным параметрам, в значительной степени совпадают. Например, продолжительность акклимации, определяемая по установлению постоянного уровня метаболизма, составляла у рыб от 6 до 12 суток (Prosser, 1964), по изменению уровня летальных температур у радужной форели *Salmo gairdneri*, карася *Carassius auratus* и плотвы *Rutilus rutilus* – две недели (Шкорбатов, 1973). Многие авторы, в том числе Дудоров (Doudoroff, 1942), исследовавший холодовую толерантность гиреллы *Girella nigricans*, и Константинов с соавторами (1996), показавшие изменения метаболизма рыб при смене гомотермальной среды на гетеротермальную, приходят к единому заключению – исследуемые параметры начинают стабилизироваться не менее, чем через 2–7 суток.

Как направление воздействия (нагрев или охлаждение), так и доза фактора (разница температур), существенно влияют на продолжительность акклимации. Так, было показано, что стабилизация устойчивости к нагреву меченосцев *Xiphophorus helleri* в случае их переноса из температуры 19 в 31°C (Precht et al., 1966), а также восста-

новление гематологических показателей при переносе из воды с температурой 21,5 в 1°C у золотого карася *Carassius auratus* (Cattlech, Millich, 1976) происходит в течение двух недель. Продолжительность холодовой и тепловой акклимации у гуппи *Lebistes reticulatus*, тестируемая по теплоустойчивости целых организмов и актомиозину мышц, оказалась одинаковой (Шкорбатов, 1973). В опытах по температурной компенсации метаболизма радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в интервале температур от 10 до 20°C требовалось не менее четырех дней для стабилизации параметров обмена независимо от направления воздействия (Evans, 1990). Однако Клика (Klicka, 1965), исследовавший возможное включение гормонов в процессы температурной акклимации золотого карася, пришел к заключению, что акклимация к низким температурам завершается быстрее, возможно, в силу сдвига аэробных процессов в сторону анаэробных. Сходные данные по более быстрой акклимации к холоду (четыре сут), в отличие от тепловой акклимации (12 сут) у лосося *Salmo salar*, приведены в работе Петерсона и Андерсона (Peterson, Anderson, 1969). В отдельных работах, напротив, имеются ссылки на то, что акклимация к теплу происходит значительно быстрее, чем к холоду (Виленкин, 1977). Сходная этапность и продолжительность процесса свойственны и поведенческой терморегуляции многих видов морских и пресноводных рыб, обитающих в северных, южных и умеренных широтах (Лапкин и др., 1979; Голованов, 1996; Свирский, 1996).

По определению Фрая (Fry, 1947), температура или интервалы температур, в которых данная группа рыб сосредотачивается после предоставления им возможности свободного выбора, носят название избираемых или предпочитаемых. Короткая (минуты–часы) продолжительность опытов позволяет отметить сам факт реакции выбора температур, ее первый начальный этап. Однако только при длительной регистрации (2–12 суток в зависимости от ряда условий) в эксперименте и, что более сложно, в естественных водоемах удастся определить конечные избираемые температуры (КИТ), в которых в конце концов сосредотачиваются все особи, независимо от их термального прошлого (Fry, 1947). Несмотря на то, что в зону КИТ рыбы могут попадать уже на 2–4-ый день пребывания в гетеротермальных условиях (в зависимости от температуры акклимации), только начиная с 5–6

дня можно с уверенностью судить об их конечном термопреферендуме (Лапкин и др., 1979; Голованов, 1984, 1996; Свирский, 1996).

Наиболее стандартные варианты переходных процессов при выборе зоны конечного термопреферендума, наблюдаемые на начальном этапе после возникновения градиентных условий – перехлест, экспонента и ложный старт. Однако существует и возможность выбора оптимальной температуры без переходного процесса (Crawshaw, 1975; Лапкин и др., 1979; Свирский, 1996). На наш взгляд, набор стереотипов выбора, по всей вероятности, может оказаться более широким. Характерно, что динамика термоакклимационных процессов аналогична кривым переходных процессов, происходящих в ходе выбора зоны конечного термопреферендума (Строганов, 1956; Klicka, 1965; Виленкин, 1977; Evans, 1990 и др.). Как и в случае поведенческой терморегуляции, более часто встречающийся вариант – перехлест.

В опытах американских и канадских исследователей, использующих не пространственные, а так называемые пространственно-временные ихтиотроны, время выбора конечного термопреферендума сокращается до 1–4 дней. По данным Кроушоу (Crawshaw, 1975), американский сомик *Ictalurus nebulosus*, акклимированный к температуре 7°C, в градиенте температур уже в течение 10–16 час достигает зон конечных избираемых температур (23–28°C), используя преимущественно переходной процесс типа экспоненты. Аналогично, по экспоненциальной зависимости, происходил выбор оптимальной конечной зоны у большеротого окуня *Micropterus salmoides*, акклимированного в течение трех недель к низкой температуре (3°C): за 18–20 часов значения избираемых температур возросли до 26–28°C (Reynolds et al., 1976; Crawshaw et al., 1982). В наших термоградиентных опытах золотой карась, акклимированный к температуре 4°C, и радужная форель, акклимированная к 7°C, достигали зон конечных избираемых температур уже на 1–3 сутки эксперимента – 28–30 и 16° С соответственно (Голованов, 1996; Голованов и др., 1997). В естественных условиях известны факты практически мгновенного (в течение минут или десятков минут) изменения температуры среды обитания. Так, молодь нерки *Oncorhynchus nerka* из озера Бэбин дважды в сутки меняет температурный режим обитания от 3–5 до 15–18°C и наоборот (Brett, 1971).

Выбор более высоких или низких температур как показывают наши данные, происходит примерно за равные промежутки времени. Однако время выбора сокращается в том случае, когда уровень акклимационных температур располагается ближе к области эколого-физиологического оптимума гидробионтов (Голованов, 1984; Свирский, 1996). После завершения первого переходного этапа и перехода на второй этап стабильного выбора возможны отклонения величин КИТ от уровня эколого-физиологического оптимума под влиянием различных факторов, однако величина этих отклонений чаще не превышает значений 2–6°C (Reynolds, Casterlin, 1979; Голованов, 1984, 1996).

Таким образом, как в процессе температурной акклимации, так и в ходе поведенческой терморегуляции существует определенная временная последовательность реакций водных организмов на изменение температуры окружающей среды или возникновение градиента температур. Очевидно, что по мере выбора рыбами в гетеротермальных условиях новых термозон происходит их акклимация с использованием компенсаторных механизмов. Определение различных показателей акклимационных процессов в ходе выбора конечного термопреферендума является методически сложной задачей. Кроушоу (Crawshaw et al., 1982), попытался решить её косвенно, измеряя в отдельном респирометре скорость газообмена у большеротого окуня *Macropterus salmoides* при температурах, которые другие особи окуня избирали в градиенте температур. Разброс значений исследованного показателя у отдельных рыб позволил предположить неодинаковый ход акклимации. В настоящее время экспериментальные данные, характеризующие физиолого-биохимические параметры акклимации в ходе поведенческой терморегуляции, практически отсутствуют.

Характеристики как температурной акклимации, так и поведенческой терморегуляции на различных уровнях биологической организации могут видоизменяться под влиянием сезона года, фазы репродуктивного цикла и возраста гидробионтов, особенностей питания животных, их физиолого-биохимического и гормонального статуса, а также факторов среды: освещенности, солености, содержания кислорода и др. (Brett, 1970; Виленкин, 1977; Проссер, 1977; Reynolds, Casterlin, 1979, 1980; Голованов, 1996). Данный аспект проблемы, однако, в настоящей публикации не рассматривается.

Заключение

Как акклимация, так и поведенческая терморегуляция являются широко распространенными формами адаптации рыб к меняющимся температурным условиям среды. Приведенные экспериментальные и литературные данные свидетельствуют в пользу того, что между акклимацией и поведенческой терморегуляцией, несмотря на принципиальную разницу этих форм или способов освоения окружающего термального пространства, существует ряд общих черт. К наиболее важным из них следует отнести: немедленную реакцию при изменении температурных условий или предоставлении градиентных сред, последовательность прохождения процесса в 2-3 этапа определенной длительности, сходные варианты переходных процессов при компенсаторных изменениях и выборе конечных избираемых температур. Использование обеих форм позволяет водным организмам эффективно существовать в широком диапазоне температур и градиенте фактора среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 98-04-48458).

ЛИТЕРАТУРА

- Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. Экология особи, популяции и сообщества. М.: Мир. 1989. 1, 667 с.
- Виленкин Б.Я. Влияние температуры на морских животных // Океанология. Биология океана. I. М.: 1977, 18-26.
- Голованов В.К. Распределение леща, плотвы и карася в термоградиентных условиях // Автореф. дис. канд. биол. наук. М. 1984, 24 с.
- Голованов В.К. Эколого-физиологические аспекты терморегуляционного поведения пресноводных рыб // Поведение и распределение рыб. 2-е Всеросс. совещание «Поведение рыб». Борок. 1996, 16-40.
- Голованов В.К., Свицкий А.М., Извеков Е.И. Температурные требования рыб Рыбинского водохранилища и их реализация в естественных условиях // Современное состояние рыбных запасов Рыбинского водохранилища. Ярославль. 1997, 92-123.
- Ивлев В.С. Эколого-физиологический анализ распределения рыб в градиентных условиях среды // Труды совещ. по физиол. рыб М. 1958, 288-296.
- Ивлев В.С., Лейзерович Х.А. Экологический анализ распределения животных

- в градиентных температурных условиях // Труды Мурманск морск. биол ин-та. 1960. М.-Л.: Вып. 1(5), 3-27.
- Кауфман Б.З. Преферентное поведение эктотермных позвоночных. Петрозаводск. 1989, 148 с.
- Кауфман Б.З. Преферентное поведение беспозвоночных. Петрозаводск. 1995, 205 с.
- Константинов А.С., Зданович В.В. Некоторые характеристики поведения молоди рыб в термоградиентном поле // Вестн. Моск. Гос ун-та. 1993. Биология. 16, 32-38.
- Константинов А.С., Зданович В.В., Костюк Ю.А., Соловьева Е.А. Скорость изменения метаболизма рыб при смене гомотермальной среды на гетеротермальную // Вопр. ихтиол. 1996. 36, 834-837.
- Лапкин В.В., Свирский А.М., Голованов В.К. Возрастная динамика избираемых и летальных температур рыб // Зоол. журн. 1981. 40, 1792-1801.
- Лапкин В.В., Голованов В.К., Свирский А.М., Соколов В.А. Термоадаптационные характеристики леща *Abramis brama* (L) Рыбинского водохранилища // Структура локальной популяции у пресноводных рыб Рыбинск. 1990, 37-85.
- Лапкин В.В., Свирский А.М., Сонов Ю.Н. Избираемая температура и температура акклимации рыб // Зоол. журн. 1979. 58, 1659-1670.
- Озернюк Н.Д., Алексеева Т.А., Зиничев А.И., Зотин А.И. Об оптимальных температурных условиях инкубации икры // Рыб. хоз-во. 1987. 7, 44-47.
- Проссер К.Л. Температура // Сравнительная физиология животных. Т. II. М. Мир. 1977, 84-209.
- Проссер К.Л. Акклимация к холоду метаболических процессов и центральной нервной системы у рыб / Клетка и температура среды. М.-Л.: Наука. 1964, 245-262.
- Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклимации рыб // Киев. Наукова думка. 1991, 192 с.
- Свирский А.М. Поведение рыб в гетеротермальных условиях // Поведение и распределение рыб. Докл 2-го Всеросс. совещания. Борок. 1996, 140-152.
- Свирский А.М., Голованов В.К. Влияние температуры акклимации на терморегуляционное поведение молоди леща *Abramis brama* (L.) в различные сезоны года // Вопр. ихтиол. 1991. 31, 974-980.
- Строганов Н.С. Физиологическая приспособляемость рыб к пониженной температуре. М.: Изд-во АН СССР. 1956.
- Хлебович В.В. Акклимация животных организмов. Л.: Наука. 1981, 136 с.
- Шкорбатов Г.Л. Этюды общей теории адаптации // Эколого-физиол. и эколого-фаунист. аспекты адаптации водных животных. Иваново. 1986, 3-24.

- Шкорбатов Г.И.** К построению общей теории адаптации // Журн. общ. биол. 1982. 43, 775-787.
- Шмидт-Нильсен К.** Физиология животных. Приспособление и среда. Кн. 1. М.: Мир. 1982, 416 с.
- Brett J.R.** Temperature. Fishes // Marine ecology. 1. Environmental factors. N.Y. 1970, 515-565.
- Brett J.R.** Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relation in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) // Amer. Zool. 1971. 11, 99-113.
- Calett R.H., Millich D.R.** Intracellular and extracellular osmoregulation of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. // Comp. Biochem. Physiol. 1976. 55A, 261-269.
- Crawshaw L.J.** Attainment of the final thermal preferendum in brown bullheads acclimated to different temperatures // Comp. Biochem. Physiol. 1975. 52A, 171-173.
- Crawshaw L.J.** Physiological and behavioral reactions of fishes to temperature change // Temperature preference studies in environmental impact assessments: an overview with procedural recommendations. Proceed. Symp. and Panel Discuss.. Northeast Fish and Wildlife Conf (Northeast Division, Amer. Fish. Soc.). Hershey, Pa. 1976 // J. Fish. Res. Board Can. 1977. 34, 730-734.
- Crawshaw L.J., Ackerman R.A., White F.N., Heath M.E.** Metabolic and acid-base changes during selection of warmer water by cold-acclimated fish // Amer. J. Physiol. 1982. 242, 157-161.
- Doudoroff P.** The resistance and acclimation of marine fishes to temperature changes. 1. Experiments with *Girella nigricans* (Ayres) // Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole. 1942. 83, 219-244.
- Evans D.O.** Metabolic thermal compensation by rainbow trout: effects on standard metabolic rate and potential usable power // Trans. Amer. Fish. Soc. 1990. 119, 585-600.
- Fry F.E.J.** Effect of the environment on animal activity // Univ. Toronto Studies, Biol. Ser., N 54. Publ. Ont. Fish. Res. Lab. 1947. 68, 62 p.
- Fry F.E.J., Hochachka P.W.** Fish // Comparative physiology of thermoregulation 1970. 1, 79-134.
- Kelsch S.W., Neill W.H.** Temperature preference versus acclimation in fishes: selection for changing metabolic optima // Trans. Amer. Fish. Soc. 1990. 119, 601-610.
- Kinne O. A.** Non-genetic adaptation to temperature and salinity // Helgolander Wiss. Meeresuntersuch. 1964. 9, 433-458.
- Kinne O.A.** Temperature - Invertebrates / Marine ecology // Ed. O. Kinne. London. Wiley-Interscience. 1970. 1, 321-346.

- Klicka J* Temperature acclimation in goldfish: lack of evidence for hormonal involvement // *Physiol. Zool.* 1965. **38**, 177-189
- Peterson R.H., Anderson J.M* Influence of temperature change on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption of Atlantic salmon, *Salmo salar*, acclimated to two temperatures // *J. Fish. Res. Board Can.* 1969. **26**, 93-109.
- Precht H., Basedow T., Bereck R., Lange F., Theede W., Wilke L* Reaktionen und Adaptationen wechselwarmer Tiere nach einer Änderung der Anpassungstemperatur und der zeitliche Verlauf // *Kieler Meeresuntersuch* 1966. **13**, 369-401.
- Precht H., Christophersen J., Hensel H., Larcher W.* Temperature and life Berlin. Springer Verlag. 1973, 779 p.
- Precht H., Lindner E.* Reaktionen, Regulationen und Adaptationen der Tiere nach Veränderung von Temperatur und Salzgehalt Versuche mit *Zoothamnium hicketes* (Ciliata, Peritrichia) // *Kieler Meeresuntersuch*. 1966. **13**, 354-368.
- Reynolds W.W., Casterlin M.E.* Behavioral thermoregulation and the «final preferendum» paradigm / Thermoregulation in ectotherms. Symp. Richmond. 1978. // *Amer. Zool.* 1979. **19**, 211-224
- Reynolds W.W., Casterlin M.E.* The role of temperature in the environmental physiology of fishes // *Environ. Physiol. Fishes Lect. NATO Adv. Study Inst.*, Lennoxville. 12-25 Aug. 1979. New York, London. 1980, 497-518.
- Reynolds W.W., McCauley R.W., Casterlin M.E., Crawshaw L.J.* Body temperatures of behaviorally thermoregulating largemouth blackbass (*Micropterus salmoides*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1976. **54A**, 461-463.
- Roberts J.L.* Temperature acclimation and behavioral thermoregulation in cold-blooded animals / *Physiol. Adaptations Environment*. 24th Ann. Fall Meeting AFS Rochester. N. Y. August 20. 1973. // *Fed. Proc.* 1974. **33**, 2155-2161.
- Smith M.W.* Temperature adaptation in fish // *Biochem. Soc. Symp.* 1976. **41**, 43-60.
- Smith M.W.* Some aspects of environmental (phenotypic) adaptations in fishes // *Netherland. J. Zool.* 1980. **30**, 179-207.

ГАРЛОВ П.Е.

СТРЕСС КАК СОСТОЯНИЕ "ВИДОВОЙ" ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ НОРМЫ, ВОЗНИКАЮЩЕЕ ПРИ ЕДИНОВРЕМЕННОМ НЕРЕСТЕ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

В результате изучения преоптико-заднего гипофизарной нейросекреторной системы (ПГНС) у представителей осетровых и костистых рыб разработаны схемы структурной и ультраструктурной организации основных ее отделов (Гарлов, 1971). Наряду с общими чертами организации ПГНС, характерными для всех позвоночных, установлен и ряд таксономических и видовых особенностей, притом на разных уровнях структурной организации. Наиболее существенные морфологические отличия, связанные с близостью осетровых к основному стволу эволюции позвоночных и примитивностью (Гербицкий, 1951), выражены прежде всего в наличии у них проксимальной нейросекреторной контактной области (ПНКО), гомологичной срединному возвышению наземных позвоночных и отсутствию анатомической связи заднего нейрогипофиза (ЗНГ) с аденогипофизом, а также в строении нейрогемальных отделов ПГНС (рис. 1). Последние - ПНКО и ЗНГ имеют трехслойное строение, в них мощно развита таницитарная нейроглия, связывающая капиллярное русло с полостями дна воронки и гипофизарных бухт, с которыми нейросекреторные терминали (НТ) формируют аксо-вентрикулярные нейросекреторные контакты (рис. 2А). Обнаружение таких контактов у осетровых позволило доказать возможность "прямого" транс-вентрикулярного пути влияния нонапептидных нейрогормонов (НП-НГ), оказывающих нейротропный эффект на ЦНС у позвоночных (Гарлов, 1971). У горбуши, и, в меньшей степени, у налима, установлена более высокая степень организации преоптического ядра (ПЯ), где в нейросекреторных клетках (НСК) особенно ярко выражены секреторные циклические процессы. Наоборот, примитивность строения ЗНГ у горбуши мы связываем с ее особо коротким и биологически ярким жизненным циклом среди лососей, когда функция ПГНС сконцентрирована на уровне организма. Таким

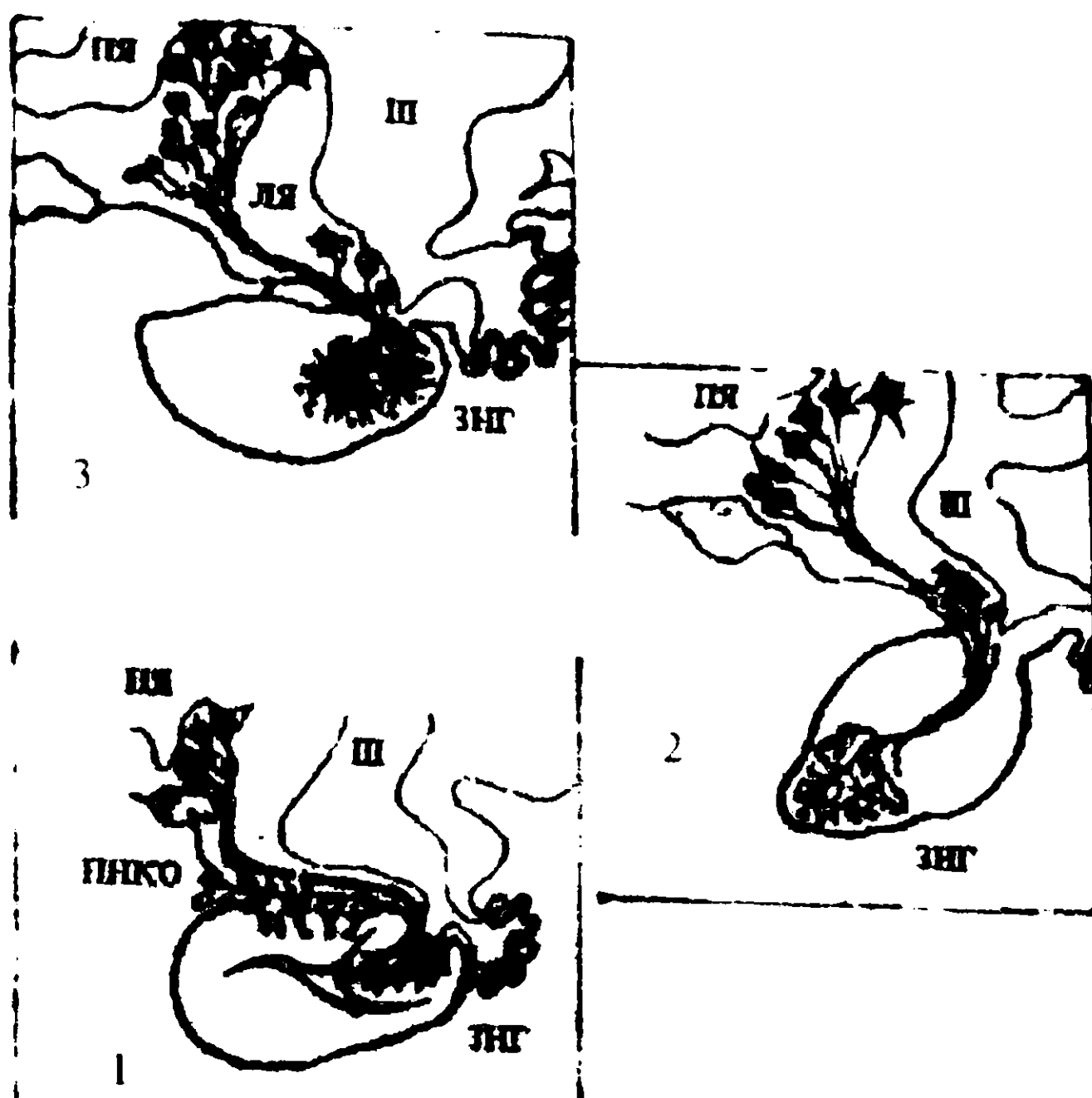


Рис 1. Особенности строения ПГС у некоторых родов рыб 1 - *Acipenser*, 2 - *Oncorhynchus*, 3 - *Lota*)

образом, удалось изучить все основные типы строения ПГС и ее отделов, формы нейросекреторных контактов у рыб уровень организации которых соответствует таксономическому положению исследованных видов (рис 2)

Функциональное состояние ПГС оценивали количественными и полук количественными морфометрическими методиками, на основе сочетания данных световой и электронной микроскопии (Гарлов, Поленов, 1996) Для наиболее объективной количественной оценки степени функциональной активности ПГС и ее отделов описан, проанализирован и представлен в виде рабочих схем секреторный цикл НСК ПЯ и экструзионный цикл НТ в ЗНГ, оба проходящие на фоне жизненного цикла НСК (рис 3а, б) Показано что смена фаз секреторного цикла НСК осуществляется путем регуляции соотношений уровней секреции, накопления и выведения из НСК нейросекреторных

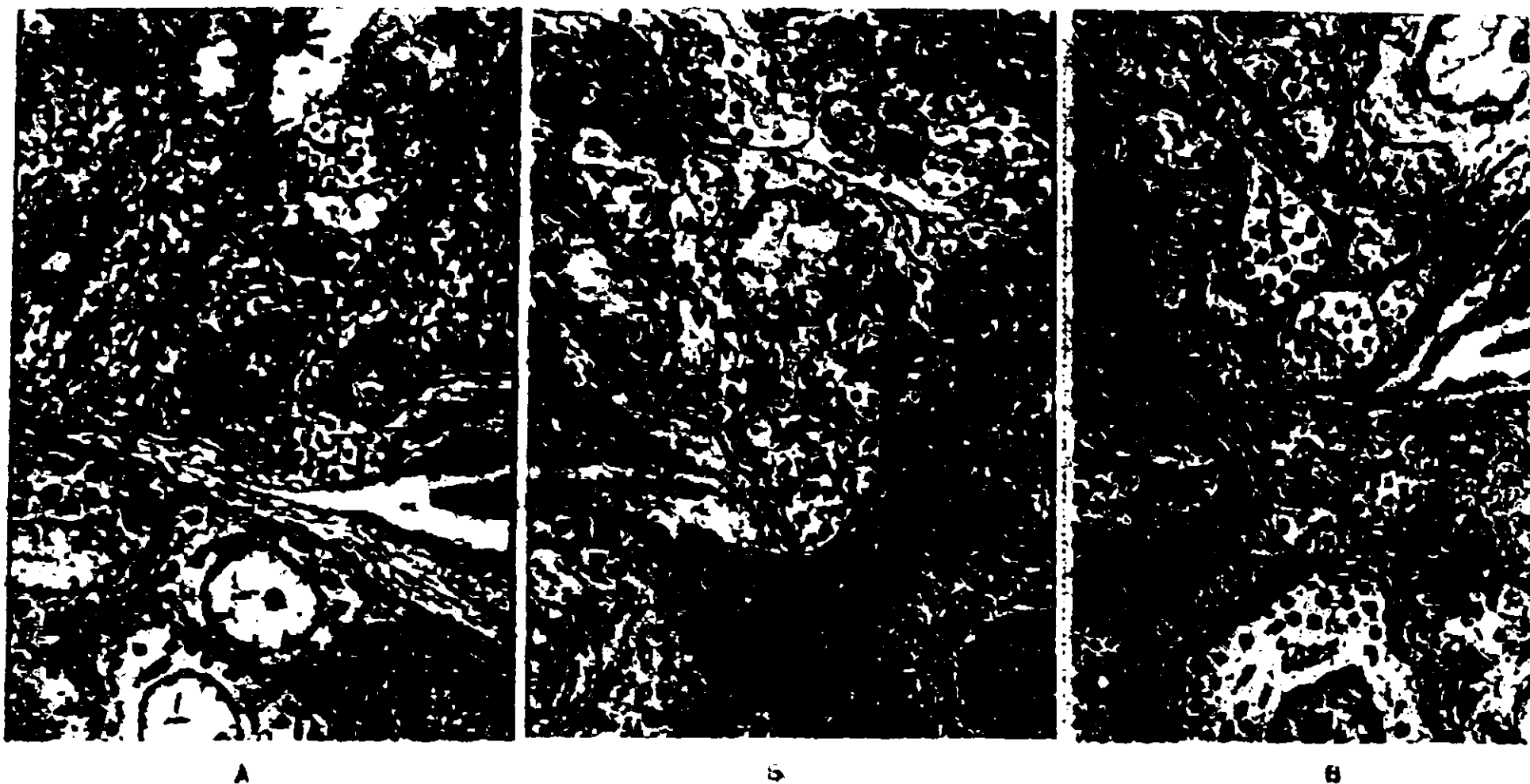


Рис. 2. Схема ультраструктурной организации ЗНГ: А - осетра, Б - горбуши, В - налим. А₁, А₂, Б - виды нейросекреторных волокон, расширений и НТ, БМ - базальная мембрана пкп, ГБ - полость гипофизарной бухты, I, II ЖК - железистые клетки (светлые, темные) 1 и 2 вида в ПрДГ, мв - мягкотное нейросекреторное волокно, ОП - базальный отросток питуицита, П - питуицит, пкп - перикапиллярное пространство СК, ПФ - полость "фолликула", образованного ЖК, Р - реснички, СК - синусоидного капилляр, Т-1, II - танициты (светлые и темные) 1 и 2 вида, тв - темное нейросекреторное волокно, ТГ - тело Герринга, Ф - фибробласт, Э - клетка эндотелия СК.

гранул (важную роль в которой выполняет комплекс Гольджи), а динамика экструзионного цикла НТ осуществляется путем регуляции соотношений уровней транспорта, накопления и экстррузии в них нейрогормонального продукта. Таким образом, взаимоотношения секреторного и экструзионного циклов и определяют уровень активности ПГНС в целом

Эколого-гистофизиологическими исследованиями, выполненными проф Н.Л.Гербильским (1951) и его учениками, впервые в период нереста была установлена четкая активация ПГНС, в плане выброса больших масс НП-НГ из ЗНГ в кровоток, у всех последовательно изученных нами разносезоннонерестующих видов рыб. осетра, горбуши и налива (Гарлов, 1971, Гарлов, Поленов, 1996). Изучена динамика функциональной активности всех отделов ПГНС и выявлена

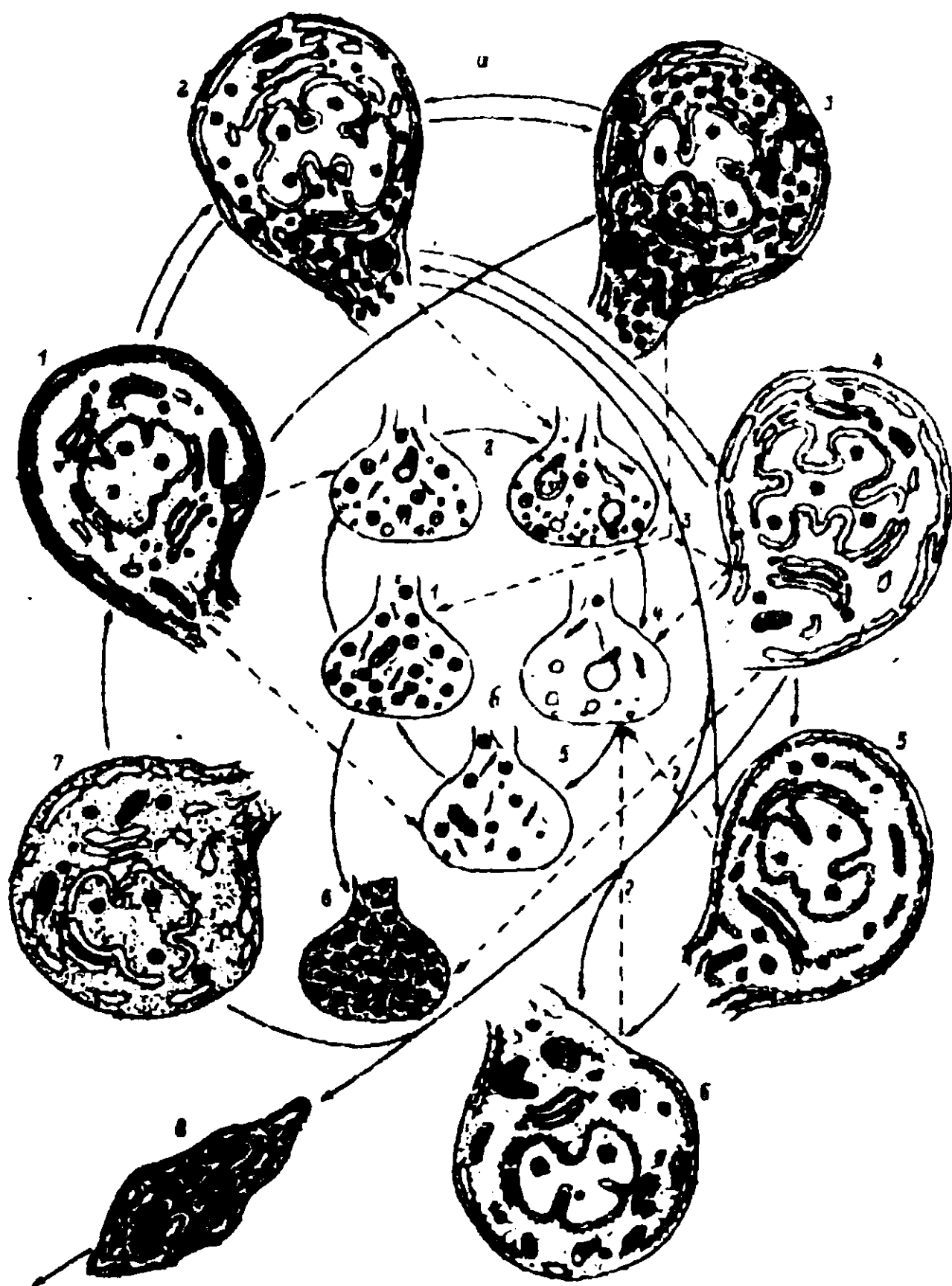


Рис. 3. Схема секреторного цикла НСК дорзальной части ПЯ (а) и экстракционного цикла НТ (б) ЗНГ. Фазы секреторного цикла НСК 1 - низкая или умеренная активность, 2 - высокая активность, 3 - депонирование нейросекреторного материала, 4 - гиперактивность, 5 - репарация органоидов, 6 - массовая деградация органоидов, 7 - покой или глубокое торможение функций ("темные" НСК). 8 - дегенерация ("темные" пикноморфные НСК). Фазы экстракционного цикла НТ 1 - депонирование, 2 - начало выведения нейрогормонов, 3 - активное выведение нейрогормонов, 4 - истощение после выведения нейрогормонов, 5 - накопление элементарных нейросекреторных гранул, 6 - переполнение полиморфными секреторными гранулами ("темные" НТ). Прерывистыми стрелками соединены перикарионы НСК с НТ их аксонов.

ее двухфазная реакция, наиболее яркая в ЗНГ (график 1, рис. 4А, Б).

У весенненерестующих самок осетра она выражена в активации выброса НП-НГ в общий кровоток в области аксо-вазальных нейросекреторных контактов (АВНК) вскоре после нереста, и в последующем снижении активности ПГНС до преднерестового уровня, что соответствует двум фазам (тревоги и резистентности) протекания стресса (график 1А). У зимненерестующего налима установлена двухступенчатая реакция ПГНС в начале нереста - снижение активности ПЯ и ЗНГ в области АВНК с активацией выброса НП-НГ в области аксо-аденарных нейросекреторных контактов (ААНК) и после нереста - яркая активация уже всех отделов ПГНС. У моноциклической осенненерестующей горбуши яркая активация всех отделов ПГНС, прежде всего массовый выброс НП-НГ из ЗНГ в начале нереста, наоборот, сменяется снижением активности всех отделов ПГНС и блокадой функции выведения НП-НГ из ЗНГ, возрастающей к моменту гибели, что доказано прежде всего электронномикроскопически. При помощи количественной оценки степени функциональной активности НТ установлено, что такая блокада происходит в результате нарушения экстраузионного цикла НТ, в отличие от известного для полициклических рыб (Гарлов, Поленов, 1996; рис. 36).

Эти исследования были развиты и во многих последующих работах. Так, выраженная активация различных отделов ПГНС, проявляющаяся в опустошении всех ее отделов от нейросекреторного материала, активации глии и гиперемии ПЯ и в ЗНГ, установлена к настоящему времени у многих видов костистых с единовременным нерестом, но "в процессе нереста" в целом, без учета стадий зрелости гонад (Peter, 1986). Например, описана активация ПЯ, либо ЗНГ у весенненерестующих карповых, сельдевых и бычковых, например бычка-мартовика (Kaul, Vollrath, 1974; Моисеева, 1975; Moitra, Medya, 1980; Polenov et al., 1986 и др.), осенненерестующих полициклических лососевых - лосося, кунджи и форели (Баранникова, 1975; Arvy et al., 1959, Honma, Tamura, 1965; Terlou et al., 1978), морских тропических рыб - дорады, зеленушки, утря и кефали (Prasado-Rao, 1970; Tripathi, Pandey, 1986; Ramadan et al., 1988) и у двоякодышащей рыбы - нотоптера (Pracash et al., 1984). При этом и в более ранних работах неоднократно указывали на возможную активацию различных отделов ПГНС у живородящих форм при размножении - хрящевых: акул, скатов (Schiebler, Hartmann, 1963) и костистых рыб: фундулюса и бельдюги

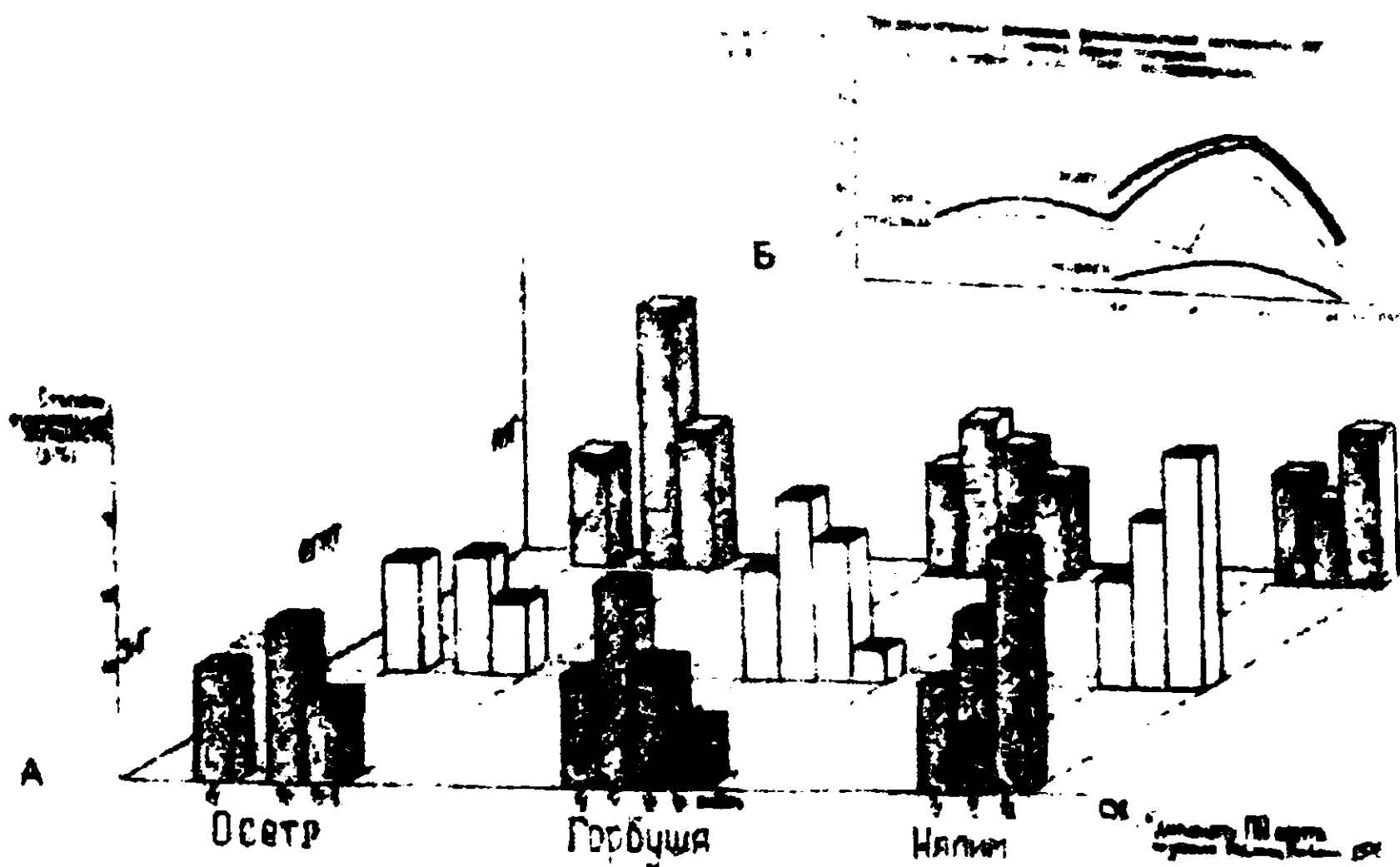


График 1. Динамика изменений функциональной активности различных отделов ПГНС в процессе нереста у изученных видов (А). Для сравнения приведены данные, полученные в дальнейшем и на других видах осетровых (Б) Обозначения в тексте.

(Sokol, 1961; Oztan, 1966) Электронномикроскопически достаточно четкие картины выброса нейрогормонов из ЗНГ в кровоток в начале нереста (при овуляции) установлены только у золотой рыбки (Kaul, Vollrath, 1974) и, в меньшей степени, у сазана (Polenov et al., 1986). С нашими результатами, полученными на горбуше, хорошо согласуются данные о функциональной блокаде ЗНГ после нереста у самцов мойвы, большинство которых погибает в этот период (Оганесян, 1986). И, наконец, предварительные результаты дальнейшего развития работ на осетровых показали, что активация ЗНГ в период нереста происходит практически у всех изученных видов: белуги, осетра, стерляди и севрюги (Алтуфьев и др., 1995, график 1Б).

Итак, в процессе нереста у многих рыб, независимо от сезона нереста, происходит активация ПГНС, проявляющаяся в виде опустошения от нейросекреторного материала, активации глии и гиперемии всех отделов системы, но только у видов с четко выраженным едино-

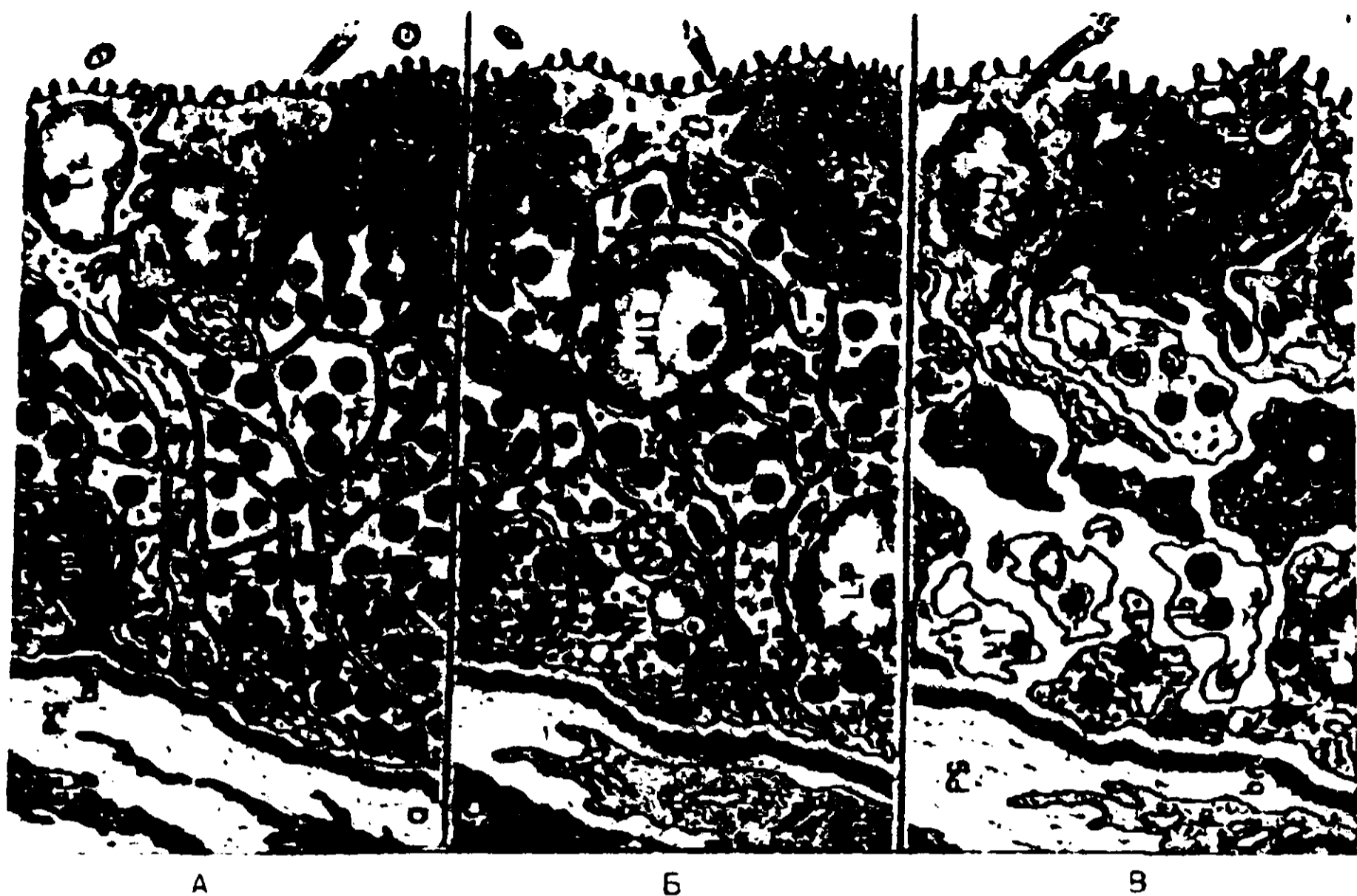


Рис. 4. Схема изменений ультраструктур ЗНГ осетра в период нереста (А, Б) и при содержании в гиперосмотической среде 32‰ (Б, В). А - перед нерестом НТ богаты элементарными нейросекреторными гранулами, Б - вскоре после нереста как и в начальные сроки гиперосмотического воздействия (1,5 - 6 час.), в НТ резко возрастает концентрация синаптических пузырьков и остаточных гранул, активируются глия и сосуды. В - к концу сроков выдерживания (к 10 час. в сублетальном состоянии особей) многие НТ разрушаются, возрастает содержание "темных" и дегенерирующих НТ. Обозначения те же, что на рис. 2

временным нерестом, как, например, у изученных нами осетра, налима, горбуши (Гарлов, 1971; Гарлов, Поленов, 1996). При этом динамика изменений функциональной активности ПЯ (по комплексной количественной морфометрии на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях) сходна почти у всех изученных видов рыб (график 1А). Перед нерестом НСК в ПЯ находятся уже в относительно активном функциональном состоянии, а в начале нереста (V стадия зрелости гонад - СЗГ) происходит усиление синтеза нейросекреторных продуктов и их транспорта из перикарионов в аксоны, после нереста и

позже (VI, VII-II СЗГ) наблюдается постепенное снижение активности этих процессов до преднерестового уровня

На основании этих данных, а также представлений о том, что НП-НГ участвуют в детерминации нерестового миграционного поведения (Баранникова, 1975) и, главное, вызывают "нерестовый рефлекс" (Pickford, Strecker, 1977; Peter, 1986), мы предполагаем, что первоначально НП-НГ выполняют роль инициаторов нерестового поведения. Инициация нерестового поведения перед нерестом у рыб обеспечивается выведением НП-НГ, преимущественно аргинин-вазотоцина (ВТ), непосредственно из НСК в ликвор (или СМЖ) III желудочка мозга в области дендро- и сомато-вентрикулярных нейро-секреторных контактов в ПЯ, а из ЗНГ и ГНКО - в области аксо-вентрикулярных контактов у осетровых, либо по межклеточным щелям у костистых (Гарлов, 1971, Гарлов, Поленов, 1996; рис 1, 2). У большинства видов рыб нерестовое поведение сохраняется почти до конца нереста, с чем по-видимому и связана последующая активация ГГНС. Важно, что приобретение (и сохранение) брачного наряда, биологически взаимосвязанное и синхронное с нерестовым поведением, также тесно связано со стимулирующим влиянием НП-НГ на функцию меланотропоцитов метааденогипофиза, с которым ЗНГ составляет единый комплекс (рис. 1, 2). Морфологически это выражено в виде последовательной активации НГ в области ААНК в ЗНГ у налима (график 1А). Ведущую роль в этом процессе вероятно также выполняет ВТ, стимулирующий (при стрессе) выброс гормонов опиоидного ряда, в частности АКТГ и α -МСГ, т.е. вызывающий кортиколиберноподобный эффект (Donaldson, 1981). В начале нереста активация ГГНС выражена максимально (график 1А), поскольку в моменты овуляции и спермации возрастает потребность в НП-НГ, стимулирующих сокращение гладкой мускулатуры гонад (Ozlan, 1966; Гарлов, Поленов, 1996). Показана ведущая роль в этих процессах изотоцина (ИТ), обладающего десятикратно большей тонической активностью, чем ВТ (Pickford, Strecker, 1977; Peter, 1986). Не менее важно, по-видимому, и участие НП-НГ в поддержании водно-солевого баланса организма, учитывая прогрессивное оводнение мышц в процессе миграции и нереста, особенно у полициклических лососей (Arvy et al., 1959, Robertson et al., 1961, Баранникова, 1975) И, наконец, в процессе нереста и особенно после него, НП-НГ участвуют в защитно-приспособительных реакциях организма на физиологический стресс.

которым, по нашему представлению, является нерест у многих видов рыб, особенно у лососевых (Гарлов, 1971; Гарлов, Поленов, 1996).

Для проверки гипотезы об участии ПГНС в реакции организма именно на стресс в период нереста нами был проведен сравнительный анализ морфо-функциональных механизмов активации ПГНС при нересте и при адекватном для проходных рыб стрессе, вызванном содержанием в гипертонической среде NaCl 17, 22 и 32‰ (Гарлов, Поленов, 1971). Установлена сходная активация ПГНС, связанная с массовым выбросом НП-НГ в кровоток в обеих ситуациях (рис. 4А, Б). Однако, степень активации структур и ультраструктур ЗНГ в опытах была выражена более ярко, а при максимальном воздействии (32‰) установлены даже патологические изменения ультраструктур, особенно в НГ (рис. 4В). Это подтвердило общеизвестное представление о прямой зависимости степени активации ПГНС от интенсивности и продолжительности воздействия (Гарлов, Поленов, 1971, 1996; Eddy, 1981). Поэтому активацию ПГНС при нересте у изученных видов мы и рассматриваем как результат естественного физиологического стресса и считаем возможным оценить ее по степени выраженности, как среднюю при остром стрессе (Billard et al., 1981). Блокада функции ЗНГ после нереста у моноциклических видов, возможно, соответствует состоянию шока в условиях сверхсильного стресса. Предполагается, что при стрессе НП-НГ снижают степень функциональной активности желез-мишеней после их гиперфункции, обеспечивая, таким образом, водно-солевой и метаболический гомеостаз организма (Гарлов, 1971; Polenov et al., 1986; Гарлов, Поленов, 1996). С этим согласуются и данные Баранниковой (1975), показавшей снижение функциональной активности интерренальной ткани и уменьшение содержания кортикостероидов в крови после нереста у осетра по сравнению с преднерестовым состоянием. Активность щитовидной железы у самок осетра после нереста также снижается (Гарлов, Поленов, 1971, 1996).

К настоящему времени уже известно, что блокада выведения НП-НГ у моноциклических животных сопровождается состоянием гиперкортицизма (Robertson et al., 1961; Баранникова, 1975; Donaldson, 1981), видимо являясь его следствием (Гарлов, Поленов, 1996). Предполагается, что в основе дезинтеграции нейроэндокринных взаимоотношений лежит нарушение механизмов саморегуляции в гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системе (Robertson et al., 1961, Дильман, 1972; Donaldson, 1981). При этом особо важную, возможно

иницирующую роль в ускорении процессов старения организма и быстрой гибели рыб играют последовательные дисфункции ПГНС и в итоге - выключение функций НП-НГ (Гарлов, Поленов, 1996).

Полагаем, что координация взаимоотношений экстружинного и секреторного циклов (рис. 3) в период нереста и определяет характер участия НП-НГ в защитно-приспособительных реакциях организма на стресс (по принципу "согласованность-разобщенность", что имеет приспособительное значение соответственно - на организменном, либо, у моноциклических видов - на популяционно-видовом уровне). Возможные пути влияния НП-НГ и функциональная роль ПГНС у рыб в период нереста приведены на схеме (рис. 5В), отражающей прежде всего динамику поэтапного участия ПГНС в процессе нереста, т.е. на разных СЗГ. Здесь отражено и развитие наших идей об узко специализированном и генерализованном влиянии НП-НГ на органы-мишени, опосредующих нерест у осетровых и костистых (рис. 5А, Б). Таким образом, естественный физиологический стресс возникает при нересте, по-видимому, у многих видов рыб, что наглядно доказывают и предварительные результаты дальнейшего развития исследований ПГНС у осетровых (график 1Б). Более того, степень его выраженности даже у полициклических видов может достигать при этом критических для организма пределов, поскольку элиминация части особей, особенно самцов, уже после первого нереста (например, семги, мойвы, некоторых видов бычков), широко распространена. Поэтому мы считаем возможным рассматривать такой стресс как состояние физиологической нормы для данного вида и, в осторожной форме, предполагаем, что при максимальной выраженности он может выступать как фактор естественного отбора у полициклических видов, либо, у моноциклических видов, как важный механизм, обеспечивающий смену поколений.

Стресс, который у всех животных характеризуется прежде всего нарушением метаболического равновесия в сторону катаболизма, принято рассматривать как результат воздействия конкретного стрессорного агента, систематизировать и характеризовать его по природе такого воздействия (Billard et al., 1981, Donaldson, 1981). Однако стресс при нересте у изученных видов рыб, характеризующийся также яркими катаболическими изменениями, возникает, как мы полагаем, вследствие усложнений взаимоотношений важнейших физиологических процессов, имеющих разнонаправленный адаптивный характер.

Действительно, материально-энергетические ресурсы организ-

бисгенетического закона. Естественно, что все эти процессы, имеющие важнейшее адаптивное значение, характеризуются состоянием метаболического равновесия - оптимальной для данного этапа онтогенеза сбалансированностью ана- и катаболических процессов. Во-вторых (2), во взрослом организме реализуется весь комплекс циклических репродукционных процессов (к которым относятся все этапы закладки, дифференцировки и развития гонад, половое созревание и размножение), отражающих, прежде всего, функции организма как самовоспроизводящейся системы (Анохин, 1948). Эти репродукционные процессы отражают функции организма как составной части систем надорганизменного уровня (например, популяции и вида) и имеют надорганизменное адаптивное значение (для каждой из этих систем). Эти направления имеют известные различия и по характеру обмена веществ в организме - процессы первого направления (1) характеризуются пластическим обменом, второго (2) - генеративным. В онтогенезе эти параллельно протекающие процессы находятся в динамическом равновесии, соответствующем этапу жизненного цикла особи. Однако, в период размножения равновесие между ними может нарушаться и репродуктивные процессы (2) могут доминировать. Такое доминирование процессов надорганизменного адаптивного характера, практически только потребляющих материально-энергетические ресурсы организма ("на экспорт", в виде половых продуктов и усиления катаболизма в связи с размножением), может вызвать конфликт между (1) и (2) процессами в виде нарушения метаболического равновесия и, в итоге, истощения материально-энергетических ресурсов организма. Мы считаем, что возникающий в процессе нереста у изученных видов рыб стресс и отражает данное явление общеорганизменного уровня. При этом адаптивная реакция ПГНС, имеющая защитно-приспособительный характер, и направлена на восстановление метаболического равновесия путем снижения уровня катаболических процессов. В качестве рабочей предлагаем следующую формулировку такой возможной закономерности: "в период размножения рыб возникает явление доминирования процессов надорганизменного адаптивного характера (связанных с нерестом) над циклическими процессами "нормального" функционирования организма, что может вызвать конфликт в виде нарушения метаболического равновесия и вызвать физиологический стресс, степень выраженности которого и отражает уровень доминирования".

И, наконец, стресс, возникающий при нересте, мы рассматриваем как конечное звено в прогрессирующих этапных процессах, обеспечивающих явление снижения степени эврибионтности проходных рыб в процессе полового созревания, миграции и нереста (Гербильский, 1951; Баранникова, 1975). Поскольку дальнейшие исследования этого явления представляют для нас большой интерес как в научном, так и в прикладном аспектах, предлагаем краткую рабочую гипотезу о нейроэндокринных механизмах снижения степени эврибионтности рыб при размножении.

Прежде всего, НП-НГ играют важную роль в детерминации нерестового миграционного поведения (Баранникова, 1975), создавая в ЦНС (в комплексе с половыми гормонами) "половую доминанту". Инициация нерестового поведения, вызванная влиянием на ЦНС НП-НГ (преимущественно ВТ), связана с эмоциональным стрессом, особенно выраженным у самцов. Напомним, что в период нереста НП-НГ возможно способствуют овуляции и спермации (преимущественно ИТ, либо окситоциноподобный НП-НГ у осетровых), стимулируя сокращения гладкомышечных элементов как самих гонад, так и их регуляторных кровеносных сосудов (помимо нейтропроводниковых механизмов регуляции), потенцируют действие половых гормонов (тормозят выброс ЛГ-РГ и увеличивают чувствительность к нему гонадотропоцитов), участвуя в регуляции генеративной и эндокринной функций гонад, стимулируют секрецию АКТГ, ТТГ, пролактиноподобного гормона (Сироткин и др. 1987). Функция ПГНС в нересте (по типу физиологического стресса) особенно ярко проявляется в связи с широким влиянием НП-НГ на комплекс висцеральных органов - выделительную систему, гладкую мускулатуру сосудов (периферических эндокринных желез, пищеварительного тракта), депо жиров и углеводов. Степень выраженности такой реакции ПГНС находится в прямой зависимости от "интенсивности" протекания нереста (и в обратной - от его кратности, снижаясь к растянутому и порционному нересту).

Таким образом, последовательные реакции ПГНС в процессе размножения, как одного из верхних интегрирующих звеньев (повидимому совместно с гипоталамо-гипофизарно-гонадной, адрено-лювой, тиреоидной и соматомединовой системами), вероятно и отражают ее участие как в поэтапном снижении степени эврибионтности организма (эффект влияния НП-НГ на поведение и репродуктивную систему), так и в поддержании метаболического равновесия (висцеро-

тропный эффект НП-НГ). Мы предполагаем, что регуляция такой циклической динамики изменений степени эврибионтности организма в онтогенезе особи осуществляется, в основном, по принципу саморегуляции на фоне истощения организма в результате миграций и нереста. Необходимо учитывать, что максимально сниженный (в период нереста) уровень физиологической устойчивости организма производителей (ярким показателем которого является состояние ПГНС) предъявляет особо жесткие требования к разработке и применению биотехники промышленного рыбоводства. Так, в основе биотехники управления размножением рыб, прежде всего, должен быть заложен принцип физиологически адекватных воздействий (в пределах "физиологической нормы" для данного вида и этапа репродуктивного цикла особи), учитывающих прежде всего эколого-физиологические особенности исходного состояния организма. При этом комплексный экологический подход (экологические воздействия - подход эмпирический по своему происхождению) необходимо сочетать с "физиологическим" (использование наиболее современных гормональных препаратов и других биоактивных веществ). И, наконец, необходимо использовать также и принцип поиска наиболее эффективных воздействий, в первую очередь, на центры интеграции управляемой функции (исторически закономерно, что такие воздействия развивались, например, по линии "обратной" связи: гонады - гипофиз - гипоталамус, в этой системе) и, в естественные периоды функциональной лабильности (между периодами длительной стабилизацией функций, например, осенью или весной), когда сопротивление организма к различным воздействиям ("неспецифически") ослабевает (например, на заключительных этапах размножения). Некоторые из указанных принципов мы и пытались учесть в рыбохозяйственных разработках (Гарлов, 1990).

ЛИТЕРАТУРА

- Алтуфьев Ю.В., Шевелева Н.Н., Гераскин П.П. Видовые особенности состояния нейрогипофиза осетровых до, во время и после нереста // Нейро-эндокринология-95. Тезисы докл. IV Всеросс. конф. СПб.: Наука. 1995, 5.
- Анохин П.К. Системогенез как общая закономерность эволюционного процесса // Бюлл. exper. биологии и медицины. 1948 XXVI, 81-99.
- Баранникова И.А. Функциональные основы миграций рыб. Л.: Наука. 1975, 210 с.
- Гарлов П.Е. Эколого-гистофизиологическое исследование нейрогипофиза у

- русского осетра // Научные сообщения института биологии моря 1971 Вып 1, 52-56.
- Гарлов П.Е., Поленов А.Л. Экспериментальное исследование нейрогипофиза у осетровых // Научн. сообщ. Ин-та биол. моря. 1971 Вып. 2, 56-59
- Гарлов П.Е. Новые методы управления размножением промысловых рыб // Рыбное хозяйство 1990. 11, 43-46
- Гарлов П.Е., Поленов А.Л. Функциональная цитоморфология преопитико-гипофизарной нейросекреторной системы рыб // Цитология. 1996 38, 275-299.
- Гербицкий Н.Л. Анализ особенностей и взаимосвязи гистологических и анатомических структур в процессе эволюции вида и его значение для эволюционной гистологии // Труды IV Всесоюзного съезда анатомов, гистологов и эмбриологов. 1951. 1, 41-45.
- Дильман В.М. Почему наступает смерть. Л.: "Медицина". 1972, 158 с.
- Моисеева Е.Б. Гистофизиология гипоталамо-гипофизарной системы морских рыб в связи с типом нереста // Тр. ВНИРО. 1975. 111, 106-124.
- Оганесян С.А. Изменение морфофункционального состояния гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы баренцевоморской мойвы в связи с миграцией и нерестом // Экология и биологическая продуктивность Баренцева моря: Тез. докл. Всесоюз. конф. Мурманск. 1986, 239-240.
- Сироткин А.В., Поленов А.Л., Гарлов П.Е. Участие нонапептидных гормонов в регуляции репродуктивной функции животных. // "Итоги науки и техники", М изд. ГКНТ. ВИНТИ, АН СССР. 1987 15, "Нейроэндокринные механизмы воспроизводства диких и сельскохозяйственных животных", 21-30.
- Arvy L., Fontaine M., Gabe M. La voie neurosecretrice hypothalamo-hypophysaire des Teleosteins // J. Physiol. 1959. 51, 1031-1085.
- Billard R., Bry C., Gillet C. Stress, environment and reproduction in Teleost fish. In: Stress and Fish (ed. A. D. Pickering). Acad. Press. L., N-Y.: 1981, 185-208.
- Donaldson E.M. The pituitary - interrenal axis is an indicator of stress in fish. In: Stress and Fish. L., N-Y.: 1981. 11-48.
- Eddy F.B. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: Stress and Fish. Acad. Press, L., N-Y.: 1981, 77-102.
- Honma J., Tamura E. Studies on the Japanese chars of the genus *Salvelinus*. I. Seasonal changes in the endocrine glands of the Nikko-Iwana, *Salvelinus leucomaenus pluvius* (Hildendorf) // Bull. Jap Soc. Sci. Fisch. 1965.31, 867-887.
- Kaul S., Vollrath L. The goldfish pituitary. II. Innervation // Cell Tiss. Res. 1974 154, 231-249.
- Moitra K.S., Medya Ch.B. Morpho-histology of the hypothalamo-neurohypophy-

- sial system in relation to gonadal maturation in *Cirrinus mrigala* (Ham.), a freshwater indian carp // Anat Anz. 1980. 148, 409-421.
- Ozlan N. The structure of the hypothalamic neurosecretory cells of *Zoarces viviparus* L. under the conditions of constant dark and light during the reproductive cycle // Z. Zellforsch. 1966. 75, 66-82.
- Peter R.E. Vertebrate neurohormonal systems // Vertebrate endocrinology Fundamentals and biomedical implications N.Y.: Acad. Press, 1986. 1, 57-104.
- Pickford G.E., Strecker E.L. The spawning reflex response of the killifish, *Fundulus heteroclitus*: isotocin is relatively inactive in comparison with arginine vasotocin // Gen. Compar. Endocrinol. 1977. 32, 132-137.
- Polenov A.L., Kornienko G.G., Belenky M.A. The hypothalamo-hypophysial system of the wild carp, *Cyprinus carpio* L. III. Changes in the anterior and posterior neurohypophysis during spawning // Z. mikrosk.-anat. Forsch. 1986. 100, 990-1006.
- Prakash M.M., Shrivastava S.S., Belsare D.K. Correlative cyclical changes in the hypothalamo-hypophysial-gonadal system in *Notopterus chilata* (Ham.) // Z. mikrosk.-anat. Forsch. 1984. 98, 225-240.
- Prasada Rao P.D. The hypophysis of two freshwater teleosts, *Labeo calbasu* (Ham.) and *Puntius sarana* (Ham.) // Zool. Anz. 1970. 184, 335-348.
- Ramadan A.A., Ezrat A.A., Meguid N.A., Khadre S.E.M., Abdel-Aziz S.N. Cyclic histological changes in the pituitary gland of *Sparus aurata* in correlation to the gonadal cycle // Folia morphol. 1988. 36, 113-124.
- Robertson O.H., Krupp M.A., Favour C.B., Hane S., Thomas S.F. Physiological changes occurring in the blood of the Pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) accompanying sexual maturation and spawning // Endocrinology. 1961. 67, 746-773.
- Schiebler T.H., Hartmann J. Histologische und histochemische Untersuchungen am neurosekretorische Zwischenhirn-Hypophysensystem von Teleostiern unter normalen und experimentellen Bedingungen // Z. Zellforsch. 1963. 60, 89-146.
- Sokol H.N. Cytological changes in the teleost pituitary associated with the reproductive cycle // J. Morphol. 1961. 109, 219-236.
- Terlou M., Ekengren B., Hiemstra K. Localization of monoamine in the forebrain of two salmonid species, with special reference to the hypothalamo-hypophysial system // Cell Tiss. Res. 1978. 190, 417-434.
- Thripathi I.M., Pandey K. Hypothalamo-hypophysial neurosecretory system of the mud eel *Amphipnous cuchia* (Ham.) // Arch. Biol. 1986. 97, 267-277.

СТРЕСС У РЫБ: АДАПТИВНЫЙ И НЕГАТИВНЫЙ АСПЕКТЫ

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

В ходе эволюции живые организмы, расселяясь и осваивая различные экологические ниши, с одной стороны, формировали специфические адаптивные механизмы, с другой - совершенствовали неспецифическую защитную реакцию, которая необходима для противодействия резким колебаниям факторов среды. В свою очередь, физиологическая система стресса стала выступать в качестве важнейшего фактора эволюции (Беляев, 1983) и приобрела социальную значимость. Несмотря на то, что о стрессе написано множество статей и монографий, тем не менее, состояние вопроса о неспецифических реакциях остается сложным, во многом неясным, порою противоречивым. Стандартные изменения, возникающие в организме млекопитающих на экстремальные воздействия, впервые описал Селье (Selye, 1936), введя понятие «стресс». В одной из своих работ Селье (1950) определяет стресс как состояние, проявляющееся в виде специфического синдрома, который включает в себя все неспецифические изменения в организме. Позднее (Селье, 1972) понятие "стресс" трактуется как совокупность всех неспецифических изменений, возникающих под влиянием любых сильных воздействий и сопровождающихся перестройкой защитных систем организма. Хотя Селье и отмечал, что стрессорное воздействие наносит повреждение организму, тем не менее, он назвал этот ответ «генерализованным адаптационным синдромом».

Возможно, по этой причине последующие исследователи под стрессом стали подразумевать неспецифические реакции, связанные с адаптацией. Так, Митюшов (1976) отмечает, что стрессовой реакцией следует называть лишь процесс мобилизации защитных сил организма, т.е. начальный этап управления приспособительными механизмами. По Виру (1981), стресс - это состояние организма, характеризующееся развертыванием общего неспецифического механизма приспособления, чем обеспечивается положительный фон для осуществления гомеостатических реакций и мобилизуются защитные способности организма. Анализируя данную проблему, Пикеринг (Pickering, 1981) указывает на то, что под стрессом пока следует понимать экстремаль-

ные формы продолжительных серий адаптивных реакций Кассиль (1983) считает, что следует согласиться с Горизонтовым, понимающим под стрессом общую адаптивную реакцию, которая возникает в неблагоприятных жизненных условиях, угрожающих нарушению гомеостаза. Всякое внешнее воздействие на организм, требующее от него адекватной реакции путем мобилизации тех или иных защитных сил, принято (Васильев, 1991) называть стрессом. По Панину (1983) стресс - это способ достижения (приобретения) резистентности организма при действии на него повреждающего фактора. Таким образом, в предложенных формулировках стресс отождествляется с комплексом неспецифических защитных реакций организма, возникающих на различные экстремальные воздействия. В связи с этим, построение различных схем осуществляется, как правило, по однотипному принципу с перечислением ряда поэтапно происходящих защитных процессов. Однако, с другой стороны, сам Селье (1950) и ряд других исследователей (Gronow, 1974; Mazeaud et al, 1977; Peters, 1979; Pickering, 1981) отмечают, что стрессор наносит повреждение организму. Гронов (Gronow, 1974), на основе анализа данных Селье, составил следующую схему происходящих событий (рис. 1). В результате воздействия (жирная стрела) организм приводится в состояние стресса (прерывистая линия). В данном случае, стресс также приравнивается общему адаптационному синдрому, который начинается с реакции тревоги. Причем, друг возле друга, как выражение игры перемен (двойная стрела) между двумя противоположно направленными силами, проявляются как неспецифические симптомы повреждения, так и защитная реакция. Если в результате интенсивности фактора или слабости организма преобладает повреждение, то после стадии шока наступает смерть. При достаточной способности к сопротивлению происходит либо приспособление к изменившимся условиям и окончание стресса, либо постепенное снижение защитных сил (например, при хроническом воздействии), крайнее истощение организма и, как следствие, его гибель.

Здесь очень важно обратить внимание на следующее противоречие. Общий адаптационный синдром включает в себя несовместимые между собой две группы неспецифических реакций: защитные и повреждающие. Получается, что он одновременно защищает и разру-

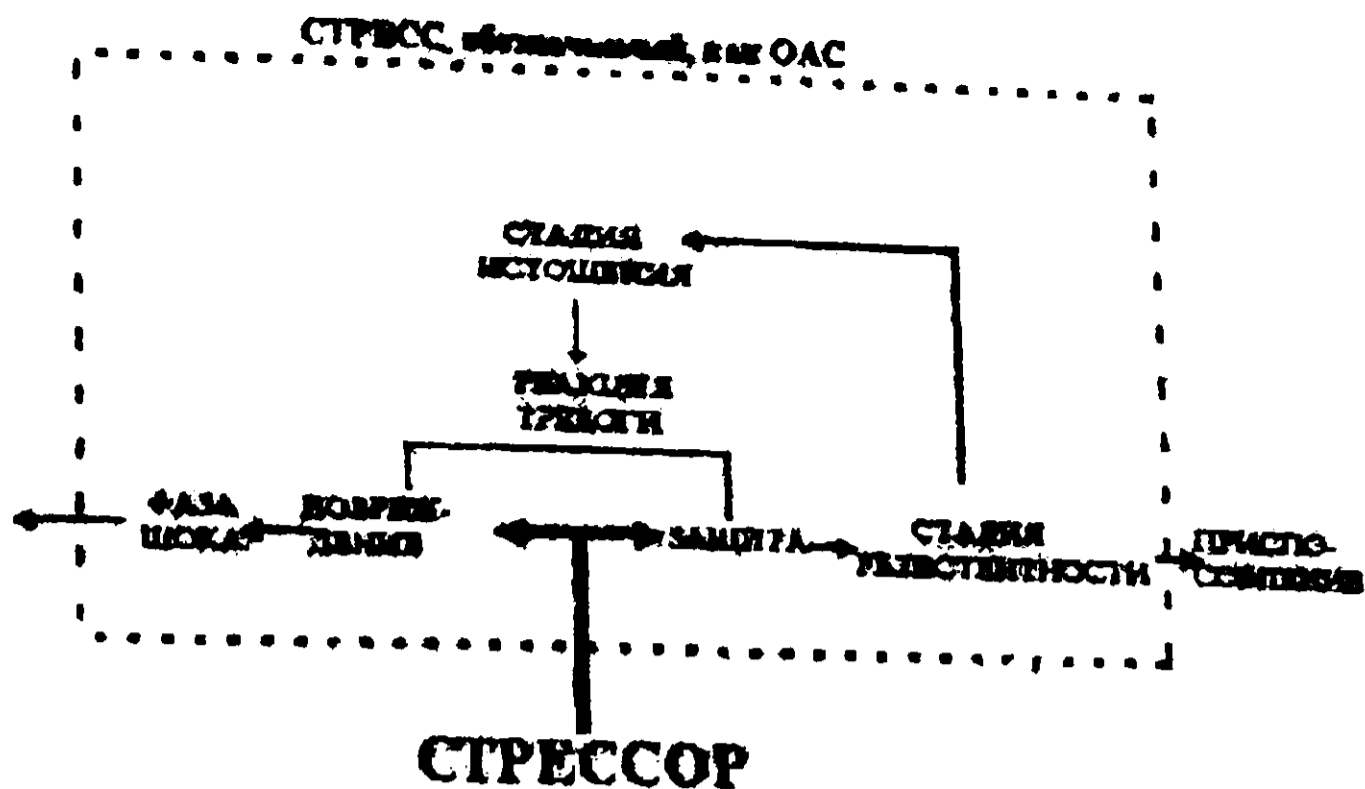


Рис. 1. Стадии развития стресс-реакции во времени, представленные Гроновым (1974) на основе данных Селье. Пояснения в тексте.

шает организм. Наиболее наглядно это видно при рассмотрении конкретных процессов, происходящих при стрессе (рис. 2). Стрессоры воспринимаются рецепторами, преобразуются в нервные импульсы, которые через афферентные нервные пути воздействуют на мозг и гипоталамус. Последний, модифицируя и координируя поступающие импульсы, осуществляет свое влияние на симпатическую нервную систему и гипофиз. В результате происходит интенсивное поступление в кровь катехоламинов и адренокортикотропного гормона (АКТГ). Наряду с общим действием катехоламинов (увеличение объема крови, силы и частоты сердечных сокращений, потребления кислорода всеми органами), адреналин способствует гликогенолизу и окислению глюкозы, готовясь к защите. Норадреналин повышает кровяное давление и способность к нападению. Выделившийся в кровь АКТГ попадает в надпочечники, стимулируя выброс кортикостероидов и новый их синтез. Кроме того, АКТГ оказывает дополнительные влияния, которые не связаны с надпочечниками. Это так называемый экстра-адреналовый эффект, который способствует сохранению кортикостероидов в плазме крови за счет снижения их утилизации в печени, ограничивает соединение кортизола с белками плазмы, мобилизует жир и участвует в отложении холестерина в печени и легких. Минералокортикостеро-

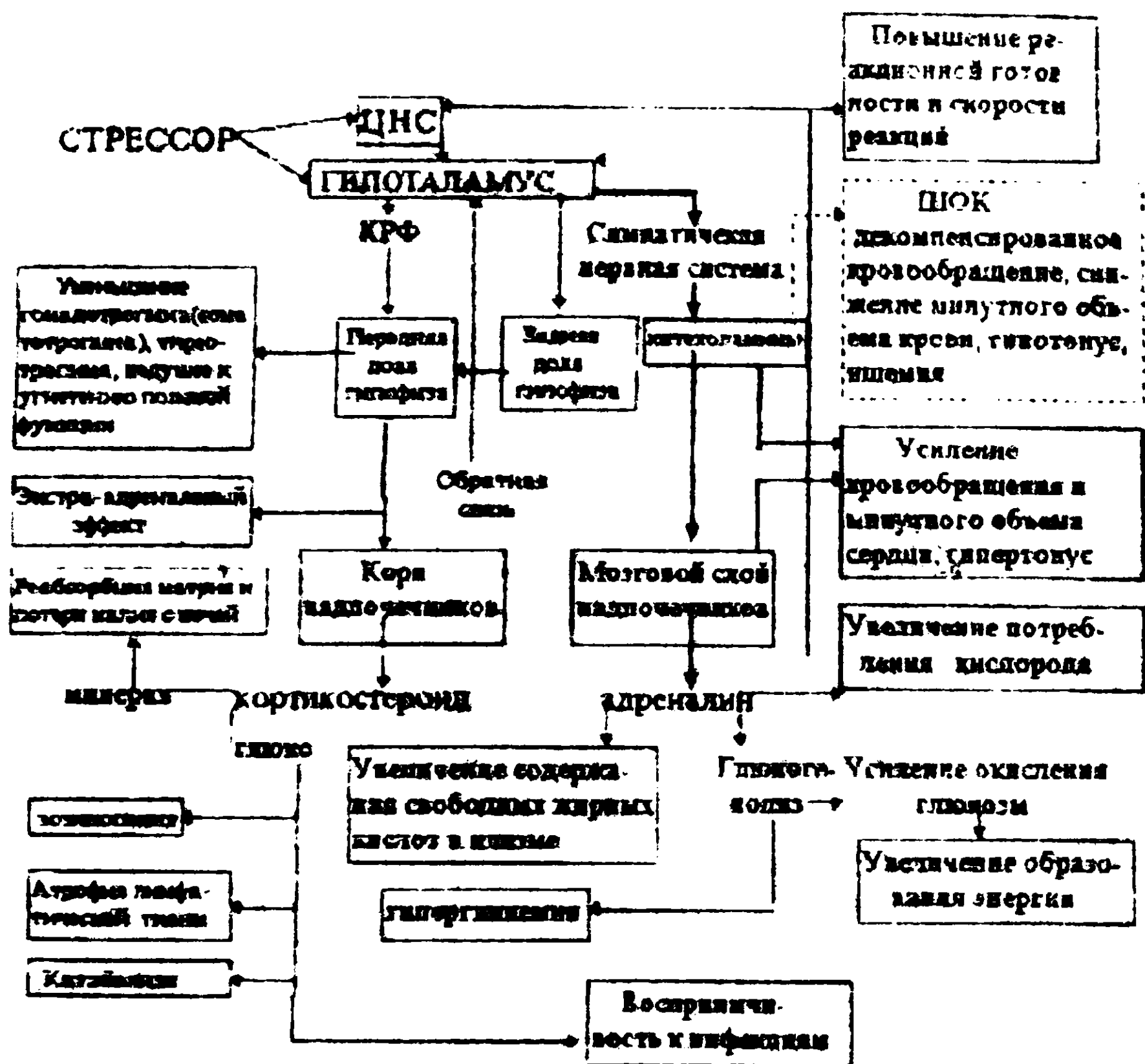


Рис. 2. Схематическое изображение некоторых реакций при стрессе у млекопитающих (Stopow, 1974). Пояснения в тексте.

иды способствуют задержке натрия и потере калия. Глюкокортикоиды оказывают влияние на клеточный состав крови (разрозненный лейкоцитоз, эозинопения, лимфопения), угнетают иммунную систему (атрофия лимфоидных органов), усиливают катаболизм, сопровождающийся выработкой энергии (глюконеогенез, повышенное содержание в плазме свободных аминокислот, гипергликемия, гликогенез в печени и повышенное выделение азота).

Симптомы, противоположные приведенным выше функциям, характеризуют собой неспецифическое повреждение, которое даже создает предпосылки для шока. Сюда относят такие процессы как

приток жидкости в ткани, концентрирование крови, гипогликемия, недостаточное обеспечение тканей кислородом, потеря натрия, метаболический ацидоз, свободное выделение гистамина. Рассматривают также состояние шока: понижение тонуса, нарушение сердечного ритма, декомпенсированное кровообращение, ишемия, уменьшение объема крови, выброшенного сердцем за минуту, снижение потребления кислорода, увеличение кислородной задолженности. При этом считается (Селье, 1972, Gronow, 1974, Mazeaud et al., 1977, Peters, 1979; Pickering, 1981), что данные нарушения вызываются нейро-эндокринными механизмами. Такой взгляд трудно согласовать с эволюционной теорией. Непонятно, как в ходе эволюции естественный отбор мог закреплять признаки, которые одновременно защищают и повреждают организм.

Этим процессам можно дать иное объяснение. Организм обладает определенным объемом защитных ресурсов. При стрессе организм нуждается в повышенных количествах энергии, поскольку только за ее счет могут усиливаться многие функции. Значительная часть процессов (рис. 2), вовлеченных в общий адаптационный синдром, как раз связана с реакциями, снабжающими организм энергией. Наблюдаемое в определенные периоды стресса недостаточное обеспечение кислородом тканей свидетельствует о том, что потребности органов в нем выше, чем его может поставлять кровь.

Какие процессы при стрессе считаются повреждениями (нарушениями)? Для разграничения реакций на защитные и дестабилизирующие, нужны критерии. Нами составлена схема защитных и дестабилизирующих процессов при стрессе (рис. 3). В постоянных условиях гомеостаз поддерживается физиолого-биохимическими системами на определенном стабильном уровне. Возмущающий агент (стрессор), с одной стороны, стремится дестабилизировать гомеостаз, с другой — усиливает функции защитных систем. Действующий фактор фиксируется рецепторами, преобразуется в нервные импульсы, которые достигают центральной нервной системы, что ведет к подключению эндокринной системы и запуску защитных реакций. Значительная их часть связана с обслуживанием энергетического обмена.

Неясен механизм начальных этапов повреждений при стрессе: вызываются ли они стрессором напрямую, или опосредовано через

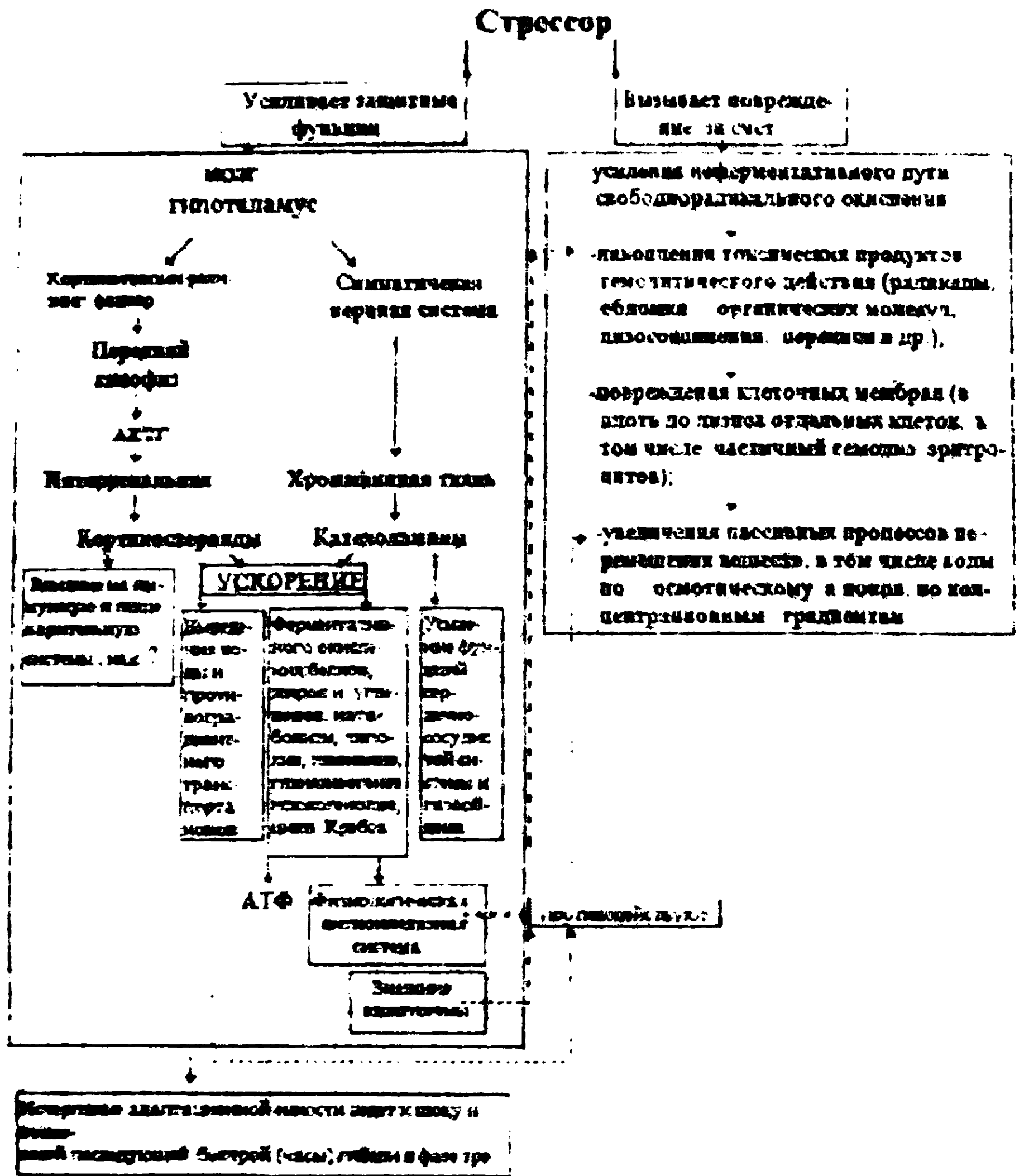


Рис. 3. Схема последовательности процессов, происходящих в начале стресса (фаза тревоги) и на стадии истощения. Пояснения в тексте.

адаптационную систему. Например, считается (Бетц, 1961), что в организме создаются благоприятные условия для усиления аутолитических процессов. Более вероятным представляется другой способ. В ор-

ганизме функционируют основной физиологический путь ферментативного катаболизма липидов и углеводов и нефизиологический путь неферментативного свободно-радикального окисления (НСРО). Продукты первого нетоксичны, а НСРО продуцирует химически агрессивные свободные радикалы и перекиси. НСРО может захватывать не только энергетические, но и пластические соединения, такие как липиды и белки мембран. Физиологический и нефизиологический пути окисления антагонистичны: они конкурируют за субстраты и кислород. Продукты НСРО, денатурируя ферменты и мембраны, ингибируют этапы физиологического окисления. С другой стороны, физиологический путь способен тормозить НСРО через антиоксидантную систему. Более подробные сведения приводит Воскресенский (1977).

Мы полагаем, что различные стрессорные воздействия вызывают усиление нефизиологического пути неферментативного свободно-радикального окисления. В результате этого в различных органах и тканях как млекопитающих (Голотин, 1977; Колосова и др. 1981; Меерсон и др., 1981), так и у рыб (Чернышов, Риц, 1971; Чернышов, Телитченко, 1973; Магомедов и др., 1974; Чернышов, Исуев, 1980) накапливаются токсические продукты. Эти соединения повреждают клеточные мембраны, вызывая лизис отдельных клеток и частичный гемолиз эритроцитов (Мартемьянов, Запруднова, 1982). Отмечается (Lassette et al., 1978; Меерсон и др., 1981), что во время стресса происходит угнетение транспортных АТФаз. При стрессе наблюдается закисление крови рыб (Hattin, Pletzen, 1974; Beggs et al., 1980). Можно полагать, что ионы водорода оказывают дестабилизирующее влияние на клеточные мембраны. В свою очередь, следствием всех перечисленных негативных воздействий на клетку является усиление таких процессов как перемещение ионов по концентрационным градиентам между клетками и внеклеточной жидкостью (Мартемьянов, Запруднова, 1982; Мартемьянов, 1983), а также между организмом рыб и внешней средой (Мартемьянов, 1983; Виноградов, Клерман, 1987). Все эти дестабилизирующие процессы ведут к снижению устойчивости организма. Если данные процессы нейтрализовать, то это вызывает повышение сопротивляемости. Так, антиоксидантная система нейтрализует вредные токсические соединения. Однако ее ресурсы ограничены. Их возможности удастся расширить за счет внешних источ-

ников, в частности, адаптогенов, которые в своей основе являются соединениями с ненасыщенными связями. Они способны нейтрализовать токсические вещества, повышая резистентность организма (Чернышов, Исуев, 1980; Чернышов, 1982). Обессоливание пресноводных рыб при стрессе можно предотвратить за счет повышения солености среды (Мартемьянов, 1989), что повышает их жизнестойкость.

Роль эндокринной системы в регуляции водно-солевого гомеостаза при стрессе во многом остается неясной. Считается, например, что гормоны при стрессе нарушают водный и ионный обмен. Однако, анализ экспериментальных данных показывает обратное. Гипофизэктомия (Ensor, Ball, 1972), интерреналэктомия и удаление телец Станниуса (Chester Jones et al., 1966), вызывают усиление пассивных процессов, следствием чего является обессоливание рыб, находящихся в пресной воде. Эти же явления наблюдаются в начальный период стресса у интактных животных. Возникает парадоксальная ситуация: с одной стороны, при стрессе наблюдается усиление функций эндокринной системы, сопровождаемое повышением концентрации различных гормонов в плазме крови. С другой стороны, на фоне высокой активности эндокринной системы происходят нарушения водно-солевого гомеостаза, характерные для ситуации, когда эндокринные органы удалены. Следовательно, функции этой системы связаны не с повреждениями, а, наоборот, направлены на противодействие им.

В ответ на стрессорные воздействия увеличивается концентрация катехоламинов в плазме крови рыб (Mazeaud et al., 1977). Адреналин усиливал поглощение натрия жабрами пресноводно-адаптированной радужной форели (Richards Fromm, 1970) и препятствовал обессоливанию организма у пресноводно-адаптированной кефали (Pic et al., 1975). Катехоламины усиливали *in vitro* противогradientный поток ионов калия из плазмы в эритроциты леща (Запруднова, 1983), лягушек и голубей (Orskov, 1956).

Следует также учитывать *handling stress*. Манипуляции с отловом животного и последующими экспериментальными процедурами ведут к сильному стрессу, в результате чего происходит выброс в кровь эндогенных гормонов. На этом фоне проводится инъекция экзогенного гормона. В сумме концентрация эндогенного и экзогенного гормона может превысить физиологически значимый уровень, вслед-

ствие чего возможно извращение эффекта

Как у млекопитающих (Селье, 1972), так и у рыб (Peters, 1982), при стрессе наблюдаются повреждения пищеварительного тракта, сморщивание желудка, нарушение контакта между клетками, атрофия слизистого эпителия, автолиз клеточных органелл, ведущих к потере функции пищеварения. Эти повреждения связывают с влиянием кортикостероидов (Palikova, Svobodova, 1995) или с другими причинами.

При стрессе в передней доле гипофиза снижается синтез гонадотропного и соматотропного гормонов (рис. 2), сопровождающееся угнетением половой функции (Selye, 1950; Brain, Nowell, 1970). Эти результаты способствовали развитию теории социального стресса (Christian, 1963, Barnett, 1964, Holst, 1969), согласно которой популяции (особенно мелких млекопитающих) способны к саморегуляции.

Важной является проблема соотношения стресса и суточных циклических процессов в организме. Переменный терморегим в диапазоне, не превышающем самопроизвольного выбора организмом, благоприятно сказывается на функциях, снижая: интенсивность обмена, суточный рацион, расход кислорода на прирост единицы массы, и повышая: эффективность использования пищи на рост, резистентность к экстремальным воздействиям (Константинов, Зданович, 1986; Константинов и др., 1996). Снижение организмом газообмена считается критерием оптимизации среды (Озернюк, 1993; Новиков, 1993).

Таким образом, при стрессе имеют место как защитные, так и дестабилизирующие процессы. Причем адаптивные реакции направлены на противодействие повреждению. Исходя из этого, стресс можно сформулировать как состояние напряжения организма, включающего в себя совокупность всех неспецифических изменений как адаптивного, так и дестабилизирующего характера, причем действие первых направлено на нейтрализацию вторых. Выделение защитных реакций и повреждений имеет важное значение для регулирования физиологического состояния в сторону повышения жизнестойкости организмов в стрессорных ситуациях.

ЛИТЕРАТУРА

Беляев Д. К. Дестабилизирующий отбор // В кн.: Развитие эволюционной теории в СССР. Л. 1983, 266-276

- Бетц Э* Материалы к изучению эндокринного синдрома, вызванного общим облучением организма М.: Медицина. 1961, 238 с
- Ведемейер Г.А., Мейер Ф.П., Смит Л.* Стресс и болезни рыб. М.: Легкая и пищ. пром-ть. 1981, 128 с.
- Виноградов Г.А., Клерман А.К.* Ионный обмен пресноводных рыб при стрессе // *Вопр. ихтиологии.* 1987. 27, 307-312
- Виру А.А.* Гормональные механизмы адаптации и тренировки Л.: Наука. 1981, 156 с.
- Воскресенский О.Н.* О связях адаптогенного и антиоксидантного действия // *Адаптация и адаптогены.* Владивосток. 1977, 91-96.
- Голотин В.Г.* Токсические перекиси при стрессе // *Адаптация и адаптогены.* Владивосток. 1977, 33-35.
- Кассиль Г.Н.* Внутренняя среда организма. М.: Наука. 1983, 225 с.
- Колосова Н.Г., Шорин Ю.П., Куликов В.Ю.* Реакции перекисного окисления липидов в печени и легких крыс при долговременной адаптации к холоду // *Бюл. exper. биологии и медицины.* 1981. 4, 436-437.
- Константинов А. С.* Влияние колебаний температуры на рост, энергетику и физиологическое состояние молоди рыб // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1993. 1, 55-63.
- Константинов А.С., Зданович В. В.* Некоторые особенности роста рыб при переменных температурах // *Вопр. ихтиол.* 1986. 26, 448-456.
- Константинов А.С., Зданович В.В., Костюк Ю.А., Соловьева Е.А.* Скорость изменения метаболизма рыб при смене гомотермальной среды на гетеротермальную // *Вопр. ихтиол.* 1996. 36, 834-837.
- Магомедов С. К., Чернышов В. И., Шеханова И. А.* Сравнительное изучение некоторых физико-химических механизмов адаптации рыб к различной солености воды // *Вопр. ихтиол.* 1974. 14, 492-498
- Мартемьянов В. И.* Динамика концентрации электролитов у пресноводных рыб при стрессе // *Пресноводные гидробионты и их биология.* Л.: Наука. 1983, 237-248.
- Мартемьянов В. И.* Чувствительность рыб к воздействиям в естественных и лабораторных условиях // *Вопр. ихтиологии.* 1985. 25, 1042-1044.
- Мартемьянов В. И.* Динамика концентрации кортикостерона и электролитов в сыворотке крови леща при стрессе // *Информ. бюлл "Биология внутренних вод".* 1987. 75, 51-54.
- Мартемьянов В. И.* Влияние солености на пресноводных рыб // *Зоол. ж.* 1989. 68, 72-81.
- Мартемьянов В. И., Запруднова Р. А.* Динамика концентрации электролитов в плазме крови, эритроцитах и мышечной ткани пресноводных рыб при стрессе // *Биол. науки.* 1982. 10, 44-49.

- Меерсон Ф. З., Архипенко Ю. В., Рожницкая И. И., Коган В. Е. Повреждение Ca^{++} -транспортирующей системы саркоплазматического ретикулума сердца при эмоционально-болевым стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1981. 4, 405-406.
- Митюшов М. И. Гипофизарно-адреналовая система и стресс // Гипофизарно-адреналовая система и мозг. Л.: Наука. 1976, 192-204.
- Новиков Г. Г. Особенности энергетики развития костистых рыб различных экологических групп при разных температурах // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. 1, 21-27.
- Озернюк Н. Д. Принципы минимизации метаболизма и оптимальные условия развития видов // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. 1, 8-15.
- Чернышов В. И. Этиология и профилактика свободнорадикальной патологии при физиологической адаптации рыб к условиям, не свойственным экологии вида // Тр. Моск. общ. испыт. природы. Отд. биол. 1982, 141-150.
- Чернышов В. И., Риз С. Б. Однотипность некоторых физико-химических механизмов ответных реакций при стрессовых воздействиях // МОИП. Доклад за 2-е полугодие 1968. Зоология и ботаника. М. 1971, 93-94.
- Чернышов В. И., Исыев А. Р. Этиология свободнорадикальной патологии у осетровых *Acipenser guldenstadti* Brant, *Acipenser stellatus* Pallas, *Huso huso* (L.) в период эмбриогенеза // Вопр. ихтиол. 1980. 20, 334-344.
- Чернышов В. И., Телитченко М. М. Физико-химические аспекты развития патологических процессов у *Cyprinus carpio* L. при резких перепадах температуры, содержания кислорода в воде и интоксикациях ядами разной природы // Вопр. ихтиол. 1973. 13, 155-166.
- Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука. 1972, 160 с.
- Barnett S.A. Social stress. The concept of stress // Carthy J.D. and Duddington C.L. (ed). Viewpoints in biology. London. Butterworths. 1964, 170-280.
- Beggs G. L., Holeton G. F., Crossman E. J. Some physiological consequences of angling stress in muskellunge, *Esox masquinongy* Mitchill // J. Fish. Biol. 1980. 17, 649-659.
- Brain P.F., Nowell N.W. The effects of differential grouping on endocrine function of mature male albino mice // Physiol. Behav. 1970. 5, 907-910.
- Chan D. K., Jones I. C., Mosley W. Hormonal control of water and ions in *Anguilla* // J. Endocrinol. 1968. 42, 91-98.
- Chester Jones., Chan D.K.O., Henderson I.W., Ball J.N. The adrenocortical steroids, adrenocorticotropin and the corpuscle of Stannius // Fish physiology. 1969. 2, 322-376.
- Chester Jones., Chan D.K.O., Rankin J.C. Steroids and pressor substances in bony fish with special reference to the adrenal cortex and corpuscles of Stannius of the eel (*Anguilla anguilla* L.) // Excerpta Medica. 1966. 132,

- Christian J.J.* Endocrine adaptive mechanism and the physiological regulation of population growth // Mayer M.V. and van Gelder R.G. (ed). *Physiological Mammalogy. Mammalian Population*. N.Y. Acad. Press. 1963. 1, 189-353.
- Ensor D. M., Ball J. N.* Prolactin and osmoregulation in fishes // *Federation Proceedings*. 1972. 31, 1615-1621.
- Gronow G.* Über die anwendung des an Säugetieren erarbeiteten begriffes «Stress» auf knochenfische // *Zool. Anz.* 1974. 192, 316-331.
- Haltingh F., van Pletzen A. F. J.* The influence of capture and transportation on some blood parameters of freshwater fish // *Comp. Biochem. Physiol.* 1974. 49A, 607-609.
- Holst D. von.* Sozialer Stress bei Tupajas (*Tupaja belangeri*) // *Z. Vergl. Physiol.* 1969. 63, 1-58.
- Lasserre P., Boeuf G., Harache Y.* Osmotic adaptation of *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. I. Seasonal variation of gill Na⁺-K⁺ATP-ase activity in coho salmon, 0+-age and yearling, reared in fresh water // *Aquaculture*. 1978. 14, 365-382.
- 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. 106, 201-212.
- Orskov S.L.* Experimental on the influence of adrenaline and noradrenaline on the potassium absorption of red blood cells from pigeons and frogs // *Acta Physiol. Scand.* 1956. 37, 299-306.
- Palikova M., Svobodova Z.* Biologické indikatory stresu u ryb (Preled) // *Bulleten VURH Vodnany*. 1995. 31, 17-27.
- Peters G.* Zur Interpretation des Begriffs «Stress» beim Fisch // *Fisch und Umwelt*. 1979. 7, 25-32.
- Peters G.* The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. // *J. Fish Biol.* 1982. 21, 497-512.
- Pic P., Mayer-Gostan N., Maetz J.* Branchial effects of epinephrine in the seawater-adapted mullet. II. Na⁺ and Cl⁻ extrusion // *Am. J. Physiol.* 1975. 228, 441-447.
- Pickering A. D.* Introduction: the concept of biological stress // In: *Stress and fish*. London and New York.: Academic Press. 1981, 1-9.
- Richards B.D., Fromm P.O.* Sodium uptake by isolated-perfused gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Comp. Biochem. Physiol.* 1970. 33, 303-310.
- Selye H.* Syndrome produced by diverse nocuous agents // *Nature* 1936. 138, 32.
- Selye H.* The physiology and pathology of exposure to stress. Montreal: Acta, 1950, 218 p.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТАНДАРТНОГО МЕТАБОЛИЗМА У РЫБ

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Уровень энергетического метаболизма у различных групп животных служит важной физиологической характеристикой, которая традиционно интерпретируется в эволюционном и экологическом аспектах, поскольку является интегральной характеристикой состояния организма (Винберг, 1956; Ивлев, 1959; Hemmingsen, 1960, Дольник, 1968, Зотин, 1988, Озернюк, 1992; Озернюк, Булгакова, 1997; Зотин, Зотин, 2000). Эволюционный аспект данной проблемы связан с обнаруженной ранее закономерностью, в соответствии с которой уровень стандартного метаболизма повышается в ходе филогенетического развития. Эта закономерность впервые была установлена В.С. Ивлевым (1959) и несколько позднее обоснован А. Хеммингсеном (Hemmingsen, 1960). Следует отметить, что идея взаимосвязи морфофизиологического прогресса животных и уровня их энергетического метаболизма принадлежит А.Н. Ссверцову (1939).

Однако, уровень стандартного метаболизма зависит также от экологических особенностей отдельных групп животных: уровня двигательной активности, места обитания, температуры среды и др. Например, данный показатель метаболизма среди беспозвоночных наиболее высокий у насекомых, а у позвоночных животных – у птиц, что связано с уровнем двигательной активности этих животных.

Стандартный метаболизм у рыб и, в особенности, влияние факторов среды были и остаются предметом детального анализа (Винберг, 1959, 1961; Ralf, Everson, 1968; Hemmingsen et al, 1969; Brett, Glass, 1973; Morris, North, 1984; Озернюк, 1985, 1992, 2000; Ка- рамушко, Шатуновский, 1991, Озернюк и др., 1993. Озернюк, Булгакова, 1997), поскольку они наиболее адекватно отражают физиологическое и метаболическое состояние этих животных. Прежде всего, была определена зависимость стандартного обмена от массы тела рыб. Для расчета этой зависимости было использовано 907 видов рыб. По-

лученная зависимость стандартного обмена от массы тела рыб выражается уравнением:

$$q_{O_2} = 0,22 \pm 0,03 W^{0,786},$$

где q_{O_2} – интенсивность дыхания (мл O_2 /г массы), W – масса тела (г). Параметры этого уравнения отличаются от аналогичных зависимостей, полученных для рыб ранее (Винберг, 1956, 1961; Озернюк, Булгакова, 1997), что связано в первую очередь с числом видов, используемых для анализа.

Уровень стандартного обмена у рыб несколько выше, чем у круглоротых с одной стороны и ниже чем у амфибий и рептилий с другой стороны, что подтверждает установленную ранее закономерность (Ивлев, 1959; Дольник, 1968; Зотин, 1988).

При изучении филогенетических закономерностей энергетического обмена часто предпринимаются поиски взаимосвязи стандартного метаболизма и филогенетического статуса тех или иных групп животных внутри отдельных таксонов (Ивлев, 1959, Дольник, 1968, Zag, 1968; Зотин, 1988; Зотин, Зотин, 2000). В частности, подобная взаимосвязь была обнаружена для птиц (Zag, 1968) и млекопитающих (Зотин, 1988). Однако взаимосвязь уровня обмена отдельных групп рыб (надотрядов и отрядов) и их филогенетического статуса не обнаружено (табл. 1).

На основании приведенных в табл. 1 данных можно говорить о зависимости стандартного метаболизма от уровня двигательной активности. Наиболее высокие значения константы a в уравнении зависимости стандартного обмена от массы тела характерны для представителей отрядов рыб с высокой двигательной активностью. Это прежде всего акулы – представители надотр. *Selachomorpha* (отр. *Carcharhiniformes* и *Squaliformes*), а среди костистых рыб - представители отр. *Clupeiformes*, *Beloniformes*, *Gadiformes*. Наиболее высокий уровень стандартного обмена среди рыб характерен для тунцов – представителей отр. *Perciformes* (Brill, 1979; Laurs, 1983; Graham et al, 1989). Эти рыбы, как известно, обладают уникальными плавательными характеристиками. Несмотря на то, что стандартный обмен измеряется у животных в состоянии покоя, у рыб с высокой двигательной активностью сильнее развита скелетная мускулатура, что отражается на уровне не только активного обмена, но и стандартного. Следует отметить, однако, что измерение уровня стандартного обмена у жи-

Таблица 1

Уровень сопоставимого стандартного обмена (константа a) у рыб N -- число видов, n -- число измерений. Систематика по Решетникову и др. 1989

Таксон	N	n	a , мл O_2 ($k=0,786$)
Класс Chondrichthyes	13	44	$0,25 \pm 0,02$
Надотряд Selachomorpha	9	37	$0,31 \pm 0,03$
Отряд Carcharhiniformes	6	27	$0,26 \pm 0,01$
Отряд Squaliformes	3	10	$0,34 \pm 0,02$
Надотряд Batomorpha	4	7	$0,16 \pm 0,02$
Отряд Rhinobatiformes	1	1	0,20
Отряд Dasyatiformes	1	1	0,20
Отряд Torpediniformes	2	5	$0,13 \pm 0,01$
Класс Osteichthyes	454	2235	$0,22 \pm 0,01$
Подкласс Sarcopterygii	4	33	$0,08 \pm 0,01$
Отряд Ceratodontiformes	1	4	0,11
Отряд Lepidosireniformes	3	29	$0,07 \pm 0,01$
Подкласс Actinopterygii	10	43	$0,32 \pm 0,03$
Отряд Polypteriformes	2	7	$0,09 \pm 0,01$
Отряд Acipenseriformes	5	33	$0,30 \pm 0,06$
Отряд Amiiformes	1	1	0,34
Отряд Lepisosteiformes	2	2	0,28
Подкласс Teleostei	440	2159	$0,22 \pm 0,01$
Отряд Clupeiformes	4	41	$0,28 \pm 0,08$
Отряд Salmoniformes	33	247	$0,24 \pm 0,03$
Отряд Myctophiformes	16	20	$0,25 \pm 0,03$
Отряд Osteoglossiformes	2	4	0,20
Отряд Anguilliformes	13	83	$0,16 \pm 0,02$
Отряд Cypriniformes	65	420	$0,21 \pm 0,01$
Отряд Siluriformes	22	105	$0,18 \pm 0,03$
Отряд Cyprinodontiformis	11	50	$0,17 \pm 0,03$
Отряд Belontiiformes	13	14	$0,46 \pm 0,03$
Отряд Gadiformes	12	55	$0,31 \pm 0,04$
Отряд Beryciformes	9	12	$0,30 \pm 0,08$
Отряд Gasterosteiformes	10	14	$0,23 \pm 0,04$
Отряд Mugiliformes	8	60	$0,22 \pm 0,02$
Отряд Synbranchiformes	2	24	$0,08 \pm 0,02$

Таблица 1 (окончание)

Таксон	N	n	a, мл O ₂ (k=0,786)
Отряд Perciformes	164	777	0,22±0,01
Отряд Scorpaeniformes	25	71	0,18±0,02
Отряд Pleuronectiformes	17	110	0,16±0,02
Отряд Batrachoidiformes	5	28	0,09±0,01
Отряд Tetraodontiformes	4	12	0,27±0,08
ВСЕ РЫБЫ	907	2279	0,22±0,03

вотных с высокой двигательной активностью представляет серьезную методическую проблему.

При изучении влияния факторов среды на уровень стандартного обмена у рыб наибольшее внимание уделяется анализу температурных воздействий (Винберг, 1956; Hemmingsen et al., 1969; Brett, Glass, 1973; Озернюк, 1985, 1992, 2000; Карамушко, Шатуновский, 1991; Озернюк, Булгакова, 1997), хотя этот показатель метаболизма зависит также от содержания кислорода в воде, времени суток, сезона, питания, упитанности и др. (Шмидт-Ниельсен, 1987). Уровень метаболизма рыб зависит от температуры среды обитания, а также меняется при кратковременных флуктуациях этого фактора. Сочетание генотипических и фенотипических адаптационных механизмов позволило рыбам заселить ниши с самыми разными температурными условиями, в том числе и отрицательными температурами.

Прежде всего, была определена зависимость уровня дыхания рыб от температуры среды обитания. Данная зависимость имеет экспоненциальный характер и описывается следующими уравнениями:

$$q_{O_2} \% = 20,841 \cdot e^{0,076 t} - \text{для константы } a \text{ в уравнении зависимости дыха-}$$

$$\text{ния от массы тела}$$

$$q_{O_2} \% = 16,846 \cdot e^{0,076 t} - \text{для интенсивности дыхания.}$$

Температурная зависимость уровня дыхания для рыб имеет вид, характерный для всех пойкилотермных и может быть описана нормальной кривой Крюга (Зотин, 1988, Зотин, Зотин, 2000), что должно отражать единую для всех этих животных зависимость, предполагающую, что температура чисто физически влияет на метаболи-

ческие процессы. Следует отметить, что не все исследователи разделяют данную точку зрения (Сушеня, 1972, Алямов, 1975)

Основополагающим адаптационным механизмом, обеспечивающим существование рыб в области низких температур, служит температурная компенсация дыхания. относительно более высокий уровень стандартного обмена у рыб, обитающих в высокоширотных областях по сравнению с тропиками и умеренными широтами (Scholander, et al., 1953; Bullock, 1955; Wohlschlag, 1960, 1963; Brett, 1972, Wallace, 1973; Озернюк и др., 1993; Озернюк, 2000).

Температурная компенсация дыхания продемонстрирована не только для рыб, но и для других пойкилотермных: ракообразных (Scholander et al., 1953; Edney, 1964; Carlisle, Cloudsley-Thompson, 1968), амфибий (Rieck et al., 1960; Campbell, Daviers, 1975; Fitzpatrick, Brown, 1975), что свидетельствует об общности механизмов приспособления этих животных к низким температурам среды.

При низких температурах скорость метаболизма у обитателей полярных широт понижена, что могло бы привести к дефициту энергии. Однако, температурная компенсация дыхания и других метаболических реакций позволяет этим животным существовать при низких температурах. Относительно более высокий уровень дыхания рыб, обитающих в высоких широтах, обеспечивается повышенным содержанием митохондрий в скелетных мышцах (Dunn, 1988). Таким образом, необычайно широкое распространение рыб связано с комплексом адаптационных механизмов, обеспечивающих выживание в различных температурных условиях среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Алямов А. Ф. Интенсивность обмена у пресноводных двусторчатых моллюсков // Экология. 1975. 1. 10-20
- Винберг Г. Г. Интенсивность обмена и пищевые потребности рыб. Минск: Изд-во Белорус. ун-та. 1956, 256 с.
- Винберг Г. Г. Новые данные об интенсивности обмена у рыб // Вопр. ихтиол. 1961. 1, 157-165
- Дольник В. П. Энергетический обмен и эволюция животных // Успехи соврем. биол. 1968. 66, 276-293
- Зотин А. И. Термодинамическая основа реакций организмов на внешние и внутренние факторы. М.: Наука. 1988, 272 с.
- Зотин А. И., Зотин А. А. Направление, скорость и механизмы прогрессивной

- эволюции. М.: Наука 1999, 320 с.
- Иалев В.С. Опыт оценки эволюционного значения уровней энергетического обмена // Журн. общ. биол. 1959. 20, 94-103.
- Карамушко Л.И., Шатуновский М.И. Количественные закономерности влияния температуры на скорость обмена у *Gadus morhua*, *Abrachichas lupus* и *Pleuronectes platessa* // Вопр. ихтиол. 1991. 32, 361-369.
- Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. М.: Наука, 1985. 175 с.
- Озернюк Н.Д. Механизмы адаптаций. М.: Наука. 1992. 272 с.
- Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: Изд-во Московского университета. 2000. 205 с.
- Озернюк Н.Д., Булгакова Ю.В. Стандартный метаболизм у рыб и круглоротых: эволюционные и экологические закономерности // Известия АН. Сер. биол. 1997. 5, 571-579.
- Озернюк Н.Д., Булгакова Ю.В., Демин В.И., Андросова И.М., Стельмащук Е.В. Механизмы эволюционных и онтогенетических температурных адаптаций метаболизма у пойкилотермных // Изв. Акад. Наук, сер. биол. 1993. 5, 703-713.
- Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. М.: Л.: Изд-во АН СССР. 1939, 610 с.
- Суцеля Л. М. Интенсивность дыхания ракообразных. Киев: Наук. Думка. 1972, 196 с.
- Шмидт-Нильсен К. Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир. 1987, 259 с.
- Brett J.R., The metabolic demand for oxygen in fish, particularly salmonids, and a comparison with other vertebrates // Respirat. Physiol. 1972. 14, 151-170.
- Brett J.R., Glass N.P. Metabolic rates and critical swimming speed of sockeye salmon (*Onchorhynchus nerca*) in relation to size and temperature // J. Fish Res. Board Canada. 1973. 30, 379-387.
- Brill R.W. The effect of body size on the standard metabolic rate of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* // Fish. Bull. 1979. 77, 494-498.
- Bullock T.H. Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms // Biol. Rev. 1955. 30, 311-342.
- Campbell R.S., Davies P.S. Thermal acclimation in the teleost, *Blennius pholis* (L.) // Comp. Biochem and Physiol. 1975. 52, 147-151.
- Carlisle D.B., Cloudsley-Thompson J.L. Respiratory function and thermal acclimation in tropical invertebrates // Nature. 1968. 218, 684-687.
- Dunn J.F. Low-temperature adaptation of oxidative energy production in cold-water fishes // Canad. J. Zool. 1988. 66, 1098-1104.
- Edney E.B. Acclimation to temperature in terrestrial isopods. II. Heart rate and standard metabolic rate // Physiol. Zool. 1964. 37, 378-394.

- Fitzpatrick L.C., Brown A.V.** Metabolic compensation to temperature in the salamander *Desmognathus ochrophaeus* from a high elevation population // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1975. 50 733-737
- Graham J.B., Lowell W.R., Sol N.C., Lairs R.M.** O₂ tension, swimming velocity, and thermal effects on the metabolic rate of the Pacific albacore *Thunnus alalunga* // *Exp. Biol.* 1989 48, 89-94.
- Hemmingsen A.H.** Energy metabolism as related to body size and respiratory surface, and its evolution // *Rep. Steno Mem. Hospital Nordisk Insulinlab* 1960 9, 7-110.
- Hemmingsen E.A., Douglas E.L., Grigg G.C.** Oxygen consumption in antarctic hemoglobin-free fish, *Pagetopsis macropterus*, and in three species of *Notothenia* // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1969. 29, 467-470.
- Lairs R.M.** Measurements of metabolic rate and determination of oxygen dissociation curves in albacore tuna // *Proc. 34th annual tuna conference*. Ed. R.J.Olson. JATTC La Jolla. California. 1983, 17.
- Morris D.J., North A.W.** Oxygen consumption of five species of fish from South Georgia // *J. Exp. Mar Biol. and Ecol.* 1984. 878, 75-86.
- Ralf R., Everson I.** The respiratory metabolism of some Antarctic fishes // *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968. 27. 27-34.
- Rieck A.F., Belli J. A., Blaskovics M.E.** Oxygen consumption of whole animal and tissues in temperature acclimated amphibians // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1960. 103, 436-439.
- Scholander P.E., Flagg W., Hoch R.J., Irving L.** Studies on the physiology of frozen plants and animals in the Arctic // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1953. 1, 1-56.
- Wallace J.C.** Observation on the relationship between the food consumption and metabolic rate of *Blennius pholis* L // *Comp Biochem. and Physiol.* 1973 45, 293-306.
- Wohlschlag D.E.** Metabolism of an antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation // *Ecology.* 1960. 41, 287-292.
- Wohlschlag D.E.** An antarctic fish with unusually low metabolism // *Ecology* 1963. 44, 557-564.
- Zar J.H.** Standard metabolism comparisons between orders of birds // *Condor.* 1968. 70, 278-279.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Итоги исследований экологических проблем онтогенеза рыб.	3
ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РЫБ	
Озернюк Н.Д. Температурные адаптации метаболизма в онтогенезе рыб.	6
М.И.Шатуновский Эколого-физиологические подходы к периодизации онтогенеза рыб..	13
Строганов А.Н., Новиков Г.Г. Особенности становления дыхательной функции в раннем онтогене- зе костистых рыб.....	20
Юровицкий Ю.Г., Сидоров В.С., Нефедова З.А. Динамика содержания липидов в эмбрионально-личиночном разви- тии лосося.....	31
Андреева А.М. Изменения белковой системы крови леща накануне нереста.....	35
Баюнова Л.В., Писевич С.Б., Семенкова Т.Б. Содержание стероидных гормонов и некоторых метаболитов в сыво- ротке крови производителей осетра и белуги разных биологических групп после гормональной стимуляции созревания.....	46
Мосягина М.В., Гарлов П.Е., Зеленников О.В., Федоров К.Е. Функциональная морфология стероидсекретирующих клеток гонад осетровых и лососевых на разных этапах онтогенеза.....	57
Бурлаков А.Б., Федоров К.Е. Становление гипофизарно-гонадальных взаимосвязей у рыб на ран- них этапах онтогенеза.....	73
Булгакова Ю.В., Андрианов Д.П., Лисовенко Л.А. Влияние экологических факторов на формирование репродуктивного потенциала многопорционных рыб на примере анчоуса Черного и Азовского морей.....	83
Девякина Г.В., Гаджиева А.Р. Развитие вкусовой системы у ряда видов осетровых рыб в связи с особенностями их экологии.....	89

Ланге М.А., Новиков Г.Г. Экспериментальные исследования механизмов роста костной (эластоидной) чешуи у тилапий	101
Михеев В.Н. Размерная селективность питания рыб: эффекты неоднородного размещения корма и конфликт мотиваций	113
Веселов А.Е., Сысоева М.И., Бахмет И.Н. Изменение локомоторной компоненты реореакции в онтогенезе молоди атлантического лосося	125
Зданович В.В. Некоторые особенности терморегуляционного поведения молоди рыб, акклимированной к постоянным и переменным температурам...	135
Яржомбек А.А. Изменение роста в постнатальном онтогенезе рыб.	142
ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ	
Сидоров В.С. Использование биохимических показателей для оценки физиологического состояния рыб при влиянии различных факторов среды (история вопроса и современные представления)	148
Кузьмина В.В. Многоуровневый анализ функций пищеварительной системы (на примере рыб).	160
Немова Н.Н., Кяйваряйнен Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева Л.А. Роль внутриклеточных протеиназ в эколого-биохимических адаптациях у пресноводных рыб	171
Высоцкая Р.У., Руоколайнен Т.Р., Крушнова М.Ю. Ферментные системы лизосом у рыб при голодании	178
Богдан В.В., Сидоров В.С., Зекина Л.М. Липиды рыб при адаптации к различным экологическим условиям. ...	188

Виноградов Г.А. Экологические аспекты ионной регуляции у пресноводных рыб	203
Регеранд Т.И., Федорова Н.В. Природный баланс катионов в воде и биохимические последствия его нарушения	216
Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Озернюк Н.Д. Характеристика экспрессии гена, кодирующего лактатдегидрогеназу-А ₄ выюна при температурной адаптации	225
Персиков А.В., Даниленко А.Н. Изменения конформационной стабильности ферментов при температурных адаптациях рыб	231
Горюнов А.С., Борисова А.Г. Сравнительное исследование термоустойчивости эритроцитов и гемоглобинов у рыб и млекопитающих	241
Голованов В.К. Температурная акклимация и поведенческая терморегуляция рыб	255
Гарлов П.Е. Стресс как состояние "видовой" физиологической нормы, возникающее при единовременном нересте у некоторых видов рыб	266
Мартемьянов В.И. Стресс у рыб: адаптивный и негативный аспекты	283
Зотин А.И. Зотин А.А., Озернюк Н.Д. Эволюционные и экологические особенности стандартного метаболизма у рыб	295